

Uridin Diphosphat Galactose Pyrophosphorylase
aus verschiedenen menschlichen Geweben
von Erwachsenen und Feten sowie
aus Erythrozyten von Galactosämiekranken
und gesunden Kontrollpersonen
in Beziehung zur Galactosämie

Hans Peter Niedermeier

Diss
München
1984

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. v. Haunerschen Kinderspital

Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

URIDIN DIPHOSPHAT GALACTOSE PYROPHOSPHORYLASE AUS
VERSCHIEDENEN MENSCHLICHEN GEWEBEN VON ERWACHSENEN
UND FETEN SOWIE AUS ERYTHROZYTEN VON
GALACTOSÄMIEKRANKEN UND GESUNDEN KONTROLLPERSONEN
IN BEZIEHUNG ZUR GALACTOSÄMIE.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans Peter Niedermeier
aus Erding
1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof., Dr., med., Schaub, Prof. Dr., med., Betke..

Mitberichterstatter: Prof., Dr., med., Paumgartner.....

Dekan: Prof., Dr., med., Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.1984.....

Ganz besonders danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. J. Schaub

für die Überlassung des Themas sowie für seine konstruktive Kritik,

Herrn Prof. Dr. K. Betke

für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen der Universitätskinderklinik München,

Herrn Priv. Doz. Dr. W. Endres

für wertvolle Hinweise zur Gestaltung der Arbeit,

Frau Dr. Y. S. Shin

für ihre ständige Betreuung und ihre zahlreichen nützlichen Ratschläge.

3.1	Einleitung	1
3.2	Themenkomplex: Selbstbestimmung und Autonomie	2
3.3	Die verschiedenen Arten der Einwilligung	3
3.4	Einwilligung nach Aufklärung	4
3.5	Einwilligungsfähigkeit: Prüfung der Einsichtsfähigkeit	5
3.6	Einwilligungsfähigkeit	6

4	Einleitung	7
4.1	Einleitung des Gewidmeten	7
4.2	Einleitung des Gewidmeten	8

GEWIDMET

5	Einleitung	9
5.1	Einleitung des Gewidmeten	9
5.2	Einleitung des Gewidmeten	10
5.3	Einleitung des Gewidmeten	11
5.4	Einleitung des Gewidmeten	12

MEINEN ELTERN

6.1	Einleitung des Gewidmeten	13
6.2	Einleitung des Gewidmeten	14
6.3	Einleitung des Gewidmeten	15
6.4	Einleitung des Gewidmeten	16
6.5	Einleitung des Gewidmeten	17
6.6	Einleitung des Gewidmeten	18
6.7	Einleitung des Gewidmeten	19
6.8	Einleitung des Gewidmeten	20
6.9	Einleitung des Gewidmeten	21
6.10	Einleitung des Gewidmeten	22
6.11	Einleitung des Gewidmeten	23
6.12	Einleitung des Gewidmeten	24
6.13	Einleitung des Gewidmeten	25
6.14	Einleitung des Gewidmeten	26
6.15	Einleitung des Gewidmeten	27
6.16	Einleitung des Gewidmeten	28
6.17	Einleitung des Gewidmeten	29
6.18	Einleitung des Gewidmeten	30
6.19	Einleitung des Gewidmeten	31
6.20	Einleitung des Gewidmeten	32

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
1.1 Überblick über die Forschungen zur Galactosämie und zu alternativen Stoffwechselwegen	1
1.2 Offene Fragen zur Pathogenese	7
1.3 Bisherige Charakterisierung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase	9
1.4 Fragestellung	14
2. MATERIAL	15
2.1 Gewebe- und Blutproben	15
2.2 Chemikalien und Biochemica	16
3. METHODIK	17
3.1 Enzymaktivitätsmessung	17
3.1.1 Probenvorbereitung	17
3.1.2 Isotopenmethode	19
3.1.2.1 Prinzip der Isotopenmethode für UDP-Galactose Pyrophosphorylase	20
3.1.2.2 Ausführung der Isotopenmethode; Meßansätze für UDP-Galactose und UDP-Glucose Pyrophos- phorylase in beiden Richtungen	23
3.1.3 Säulenchromatographie	23
3.1.3.1 Anionenaustauscherchromatographie mit DEAE- Cellulose auf Mini-Säulen	23
3.1.3.2 Ausführung mit Mini-Säulen	24
3.1.4 Flüssigkeitsszintillationszählung	27
3.1.5 Berechnung der spezifischen Enzymaktivität	28
3.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	
Ausführung in Flachbettmedien	29
3.2.1 Probenvorbereitung	30
3.2.2 Gießen der Gele (AGIF)	30
3.2.3 Lauf (AGIF/PAGIF).	31

3.2.4	Färbung für UDP-Galactose Pyrophosphorylase UDP-Glucose Pyrophosphorylase und Galactose-1- Phosphat Uridyltransferase	32
3.3.	Partielle Enzymreinigung	35
3.3.1	Anreicherung von Gewebsenzymen durch Ammonium- sulfatfällung.	35
3.3.2	Anreicherung des Erythrozytenenzyms durch Calcium-Phosphat-Gel	36
3.4	Kontrollmethoden	38
3.4.1	Spektrophotometrischer Test auf Glucose-1-P und Glucose-6-P; Messung der UDP-Glucose Pyrophosphorylase, Richtung 2	38
3.4.2	Spektrophotometrische Messung der UDP- Galactose Pyrophosphorylase, Richtung 2	39
4.	THEORIE DER ENZYMKINETIK	41
4.1	Die Michaelis-Menten-Beziehung	41
4.2	Reaktionen mit zwei Substraten	43
4.2.1	Bestimmung der individuellen Enzymkonstanten in Systemen mit zwei Substraten	45
4.2.2	Einzelne Reaktionsmechanismen bei Systemen mit zwei Substraten	46
4.2.2.1	Zufallsmechanismus unter Gleichgewichtsbedin- gungen	46
4.2.2.2	Zufallsmechanismus unter Fließgleichgewichts- bedingungen	46
4.2.2.3	Geordnete Systeme mit ternärem Komplex	47
4.2.2.4	Geordnete Systeme mit zu vernachlässigenden steady-state Konzentrationen von ternären Komplexen	47
4.2.2.5	Geordnete Systeme ohne ternären Komplex	47
4.2.3	Zur Unterscheidung zwischen verschiedenen kinetischen Reaktionsmechanismen	48
4.2.4	Beispiel: UDP-Glucose Pyrophosphorylase	48
4.3	Zwei verschiedene Enzyme katalysieren dieselbe Reaktion	51
4.3.1	Bestimmung der Enzymkonstanten bei Systemen mit zwei Enzymen und einem Substrat	54

4.4	Mögliche Ursachen für nicht-lineare Lineweaver-Burk-Darstellungen	55
4.4.1	Die Enzymreaktion zeigt vom Reaktionsmechanismus her keine Michaelis-Menten Charakteristik	55
4.4.2	Zwei verschiedene Enzyme katalysieren die gleiche Reaktion	55
4.4.3	Allosterische und kooperative Effekte	56
4.4.4	Reaktion zwischen zwei identischen Substratmolekülen	58
5.	ERGEBNISSE	59
5.1	Kinetische Studien; Verhalten der Richtung 1	59
5.1.1	Zeitverlauf der Reaktion 1	59
5.1.2	pH-Kurve	62
5.1.3	DTT-Effekt	62
5.1.4	Stabilität des Enzyms	64
5.1.5	Anreicherungsversuche	64
5.1.5.1	Ammoniumsulfatfraktionierung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in menschlichen Geweben	65
5.1.5.2	Extraktion von Hämolysaten durch Calcium-Phosphat-Gel	66
5.1.6	Spezifische Aktivitäten der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in Geweben	67
5.1.7	Aktivität der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in Erythrozyten von Normalpersonen und Galaktosämiekranken in Abhängigkeit vom Alter	69
5.1.8	Verhältnis der Aktivitäten von Hin- und Rückreaktion bei UDP-Galactose Pyrophosphorylase	71
5.1.9	UDP-Glucose Pyrophosphorylase-Aktivitäten	71
5.1.10	Lineweaver-Burk-Diagramme	72
5.1.11	"Glucose-Effekt"	82
5.2	Die Ergebnisse der Isoelektrischen Fokussierung	84
5.2.1	AGIF	84
5.2.2	PAGIF	89

6.	DISKUSSION	92
6.1	Zur Methodik	92
6.2	Zur Theorie	93
6.3	Zu den Ergebnissen	96
7.	ZUSAMMENFASSUNG	102
8.	ABKÜRZUNGEN UND ERKLÄRUNGEN	104
9.	LITERATUR	105
10.	LEBENS LAUF	113

1. EINLEITUNG

1.1 Überblick über die Forschungen zur Galactosämie und zu alternativen Stoffwechselwegen.

Die kongenitale Galactosämie ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit mit gestörtem Galactosemetabolismus und ist durch das Fehlen des Enzyms Galactose-1-Phosphat:Uridyltransferase gekennzeichnet.

Das Krankheitsbild wurde zuerst 1908 durch von Reuss beschrieben [102]. "Erscheinen sie (die Monosaccharide, der Autor) im Harn, so weist dies auf mangelhafte Oxydation oder mangelhafte Glykogenie hin ... Man wird nicht fehl gehen, wenn man die Galactosurie ... auf krankhafte Veränderungen in der Leber (Degeneration, Stauung) zurückführt und somit als ein wahres Intoxikationssymptom auffaßt ... Spricht die in solchen Fällen selten fehlende Albuminurie für eine toxische Schädigung der Niere, so weist die Galactosurie auf eine Schädigung des Leberparenchyms hin."

Eine Zusammenfassung der klinischen Symptomatik wird von Schaub und Osang angegeben [73]: " Betroffene Neugeborene erkranken schon nach der ersten Milchmahlzeit akut mit Erbrechen und Ikterus. Eine positive Reduktionsprobe im Urin muß an die Krankheit denken lassen. Wenn überhaupt, ist die Hypoglykämie diskret, während der Galactosepiegel im Blut über 10 mg/100 ml liegt. Wird der Säugling mit einer Sonde gewaltsam weiter gefüttert, kann er in kurzer Zeit im Leberkoma ad exitum kommen. Überleben die Kinder durch Zufuhr von glucosehaltigem Tee oder durch Glucoseinfusionen undiagnostiziert die ersten Wochen, entwickeln sie eine Leberzirrhose und eine Katarakt. Erst viel später wird ein Zerebralschaden bemerkt. Im Urin wird regelmäßig eine Hyperaminoazidurie beobachtet." Andere Symptome sind fakultativ, die genannten werden jedoch regelmäßig angetroffen [77, 91].

Erst Goppert [32], Mason und Turner [63] haben erkannt, daß es sich bei dieser Störung um einen angeborenen Stoffwechseldefekt im Galactosemetabolismus handelt.

Außer der von Holzel et al. [39] gefundenen Abhängigkeit der Aminoazidurie und Proteinurie von der Galactosezufuhr konnte gezeigt werden, daß auch andere klassische Zeichen der Krankheit unter galactosefreier Diät zum Verschwinden gebracht werden können [63].

Nachdem ursprünglich die Galactose für das toxische Agens gehalten wurde, sieht man heute Galactose-1-Phosphat als den pathogenetischen Faktor an [89, 90]. Nach Galactosebelastung ist in vivo eine Anhäufung von Galactose-1-Phosphat [29, 75, 76, 92], Galactose und Galaktitol [103] in Geweben und Zellen [69, 75, 76] nachweisbar, in Zellen auch in vitro [45, 76].

Kalckar et al. [45], Isselbacher und Anderson et al. [4, 43] erkannten in dem Fehlen der Enzymaktivität der Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase die Ursache der Störung. Mutationen des Gen-Lokus für Uridyltransferase verändern nicht die Eigenschaften von Galactokinase und UDP-Glucose Epimerase [78, 80]. Die Störung wird heute mehr in einer Änderung der Enzymaktivierung, der Substrataffinität oder der Konformation der Uridyltransferase gesehen als in einer völligen Abwesenheit des Enzyms [83].

Der toxische Zuckeralkohol Galaktitol entsteht beim oxidativen Abbau der überschüssigen Galactose und ist für die Ausbildung von Katarakten verantwortlich [25].

Die Therapie besteht auch heute in einer lebenslangen galactosefreien Ernährung (Genauerer bei Hsia, 40). Die Güte dieser Diät kann durch die Bestimmung von Galactose-1-Phosphat in den Erythrozyten [26, 47] kontrolliert werden, das einen besonders empfindlichen Indikator für die Zufuhr von Galactose darstellt [16, 28].

Zur Früherfassung der Krankheit wird heute hauptsächlich der Fleckentest nach Beutler [6] eingesetzt, aber auch andere Screeningtests wie der bakteriologische Hemmtest nach Guthrie oder der Phagentest nach Paigen sind gebräuchlich. Ein Fall wird auf etwa 40.000 Neugeborene entdeckt [7]. Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität der Uridyltransferase sind nicht als Screeningmethoden verwendbar.

Der Verlauf und die Ausprägung der Krankheit sind sehr variabel. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, daß Patienten trotz völliger Abwesenheit von Uridyltransferase-Aktivität geringe Mengen von Galactose metabolisieren können [11, 50]. Die Erythrozyten Galactosämiekranker besitzen auch eine gewisse Kapazität zur Verwertung von Galactose-1-Phosphat [17, 27]. Diese Befunde, zusammen mit der Beobachtung, daß Patienten mit Galactosämie mit zunehmendem Alter eine steigende Fähigkeit zur Verarbeitung exogen zugeführter Galactose zu entwickeln scheinen [96], sprachen für die Existenz eines zusätzlichen Stoffwechselweges mit Umgehung der Transferasereaktion.

Dieser alternative Stoffwechselweg schien auch in umgekehrter Richtung zu funktionieren; selbst bei streng eingehaltener galactosefreier Diät waren immer häufiger erhöhte Galactose-1-Phosphat-Spiegel in den Erythrozyten nachweisbar [27, 30, 31, 76]. Zur genaueren Abklärung dieser Befunde wurden zahlreiche Versuche in vivo und in vitro durchgeführt.

Einige galactosämische Individuen waren in der Lage, das C1-Atom intravenös applizierter $[1-^{14}\text{C}]$ Galactose zu $^{14}\text{CO}_2$ zu oxidieren [66, 79, 80], wobei diese Fähigkeit durch Progesteron oder gleichzeitig gegebenes Menthol [19, 66, 79, 80] stark erhöht wurde, während ohne Menthol oder Progesteron nur Spuren von $^{14}\text{CO}_2$ ausgeatmet wurden [19]. Ein 24-jähriger Mann mit Galactosämie schied nach einer Infusion von $[1-^{14}\text{C}]$ Galactose zusammen mit oralem Menthol markierte Menthol-Glucosiduronsäure im Urin aus [18]. In Erythrozyten stieg der Galactose-1-Phosphat-Spiegel 5 h nach einer oralen Galactosebelastung stark an, um nach 24-48 h wieder auf Null abzufallen [16]. Leberzellen eines Patienten katabolisierten $[1-^{14}\text{C}]$ Galactose mit 75 % der normalen Effektivität [95]. Fibroblasten von Kranken ohne Uridyltransferase waren imstande, Galactose mit einer gegenüber normalen Fibroblasten verminderten Geschwindigkeit zu $^{14}\text{CO}_2$ zu veratmen [8, 67] oder durch in durch Trichloressigsäure fällbare Makromoleküle einzubauen [23, 38, 71]. Petricciani et al. [67] nahmen eine Induzierbarkeit des zugrundeliegenden Abbauwegs an, nachdem die Umsatzrate von $[1-^{14}\text{C}]$ Galactose zu $^{14}\text{CO}_2$ in galactosämischen Fibroblasten in vitro stark gesteigert werden konnte, wenn die Zellen über längere Zeit der markierten Galactose ausgesetzt wurden [67]. Im Gegensatz hierzu

finden andere Untersucher eine höchstens geringfügige $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion durch Fibroblasten, Leukozyten oder Vollblut von Galactosämiekranken [24, 53, 60], möglicherweise aufgrund zu geringer Galactosekonzentrationen im Medium. Von besonderem Interesse war die Feststellung, daß Fibroblasten ohne Galactokinase-Aktivität im Gegensatz zu solchen ohne Uridyltransferase-Aktivität praktisch keine Galactose metabolisieren konnten [24, 68]. Friedman et al. [24] zogen daraus den Schluß, daß eine intakte Galactokinase ein notwendiger erster Schritt im Galactose-Metabolismus ist, sowohl für den Leloir-Weg [56], als auch für den alternativen Weg, d.h., daß beide Wege von Galactose-1-Phosphat als Substrat ausgehen.

Umgekehrt konnte in Zellkulturen auch bei galactosefreiem Medium mit Glucose als Energiequelle eine Bildung von Galactose-1-Phosphat und Galaktitol beobachtet werden [10, 31, 64, 74].

Petricciani et al. [67] haben diese Ergebnisse zusammenfassend dahingehend interpretiert, daß ein alternativer Weg, der zu CO_2 führt, existiert, der aber bei Galactosespiegeln abgesättigt ist, die viel tiefer liegen als die im normalen System vorkommenden. Man hat drei verschiedene alternative Wege diskutiert, von denen aber lediglich die Pyrophosphorylase-Reaktion eine Signifikanz im Galactosestoffwechsel des Galactosämiekranken besitzt [67].

Kalckar und Mitarbeiter [46] und Isselbacher [42] beschrieben als erste das Enzym Uridin-Diphospho-Galactose Pyrophosphorylase, das eine reversible Reaktion katalysiert (Abb. 1.b) und damit einen zusätzlichen Weg außerhalb der in biologischen Systemen üblichen Umwandlung von Galactose in Glucose auf den Leloir-Weg [Leloir, 56 und Abb. 1.a] darstellt. Der Pyrophosphorylase-Weg, der normalerweise beim Menschen überflüssig ist, wird zum Hauptstoffwechselweg für Galactose, wenn die Uridyltransferase durch einen genetischen Defekt blockiert ist [31]. Es wurde gezeigt, daß gesunde und kranke Zellen ausreichend Enzymaktivität an UDP-Galactose Pyrophosphorylase [10] sowie die Substrate UTP [93] und Pyrophosphat [21] enthalten, um das Funktionieren dieses Mechanismus zu ermöglichen. Die übrigen Substrate sind ubiquitäre Metabolite des Intermediärstoffwechsels.

Gitzelmann machte als erster eine endogene Produktion von Galactose-1-Phosphat auf diesem Weg wahrscheinlich [27], um sie dann später als einen Mechanismus der Selbstvergiftung mit Galactose-1-Phosphat bei behandelter Galactosämie zu demonstrieren [31].

Isselbacher [41] konnte zeigen, daß die UDP-Galactose Pyrophosphorylase-Aktivität in Organen erwachsener Säugetiere höher ist im Vergleich zu Organen von Neugeborenen und Föten. Dieser Befund wurde als Erklärung für das Auftreten höherer Stoffwechselkapazitäten für Galactose mit steigendem Alter bei Galactosämiekranken gewertet. Neuere Untersuchungen an menschlichem Leberenzym konnten Isselbachers Ergebnisse aber nicht bestätigen [1].

Abb. 1 a): Darstellung der Umwandlung von Galactose-1-Phosphat in Glucose-1-Phosphat auf dem Leloir-Weg:

I. Kinase-Reaktion



II. Transferase-Reaktion



III. Epimerase-Reaktion

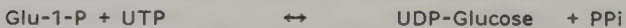


II. + III.

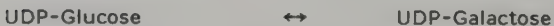


Abb. 1.b): Darstellung der Umwandlung von Galactose-1-Phosphat in Glucose-1-Phosphat auf dem Pyrophosphorylase-Weg:

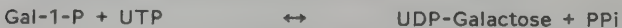
IV. UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Reaktion



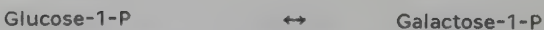
III. Epimerase-Reaktion



V. UDP-Galactose-Pyrophosphorylase-Reaktion



IV. + III. + V.



1.2 Offene Fragen zur Pathogenese

Im folgenden Abschnitt sollen einige Beobachtungen dargestellt werden, die eine Beteiligung der Pyrophosphorylase an der Pathogenese einiger Symptome bei Galactosämie wahrscheinlich machen, wobei jedoch zur Zeit die biochemischen Mechanismen weitgehend ungeklärt sind. Eine ausführliche Abhandlung hierzu findet sich bei Sidbury [91].

Die biochemischen Alterationen, die aus der Unfähigkeit des Organismus, die anfallende Galactose zu verarbeiten, resultieren und im Zusammenhang mit Symptomanifestationen stehen könnten, sind im folgenden aufgelistet [91]:

- Hemmung der Synthese von UDP-Glucose
- Anhäufung von UDP-Galactose und UDP-Acetylgalactosamin
- Hemmung der Proteinsynthese

Tierversuche an verschiedenen Spezies erbrachten teilweise widersprüchliche Ergebnisse.

An Lebern von Ratten, die mit Galactose gefüttert waren, wurde ein Anstieg von UDP-Galactose und ein Abfall von UDP-Glucose gemessen [91]. Leberzirrhosen, wie sie bei Menschen beobachtet werden, konnten jedoch im Tierversuch nicht hervorgerufen werden [91].

Durch Galactosefütterung bei Hühnern konnte eine deutliche Erhöhung von Galactose und Galactitol sowie initial auch von Galactose-1-Phosphat im Gehirn der Tiere erzeugt werden, UDP-Galactose und UDP-Glucose blieben jedoch unverändert [52]. Trotz eines erheblichen Umsatzes von Galactose-1-Phosphat und UDP-Galactose im Hirngewebe wurde Galactose nicht zur Energiegewinnung herangezogen [52].

Ein möglicher Ansatzpunkt für die Erklärung der Hirnschäden bei Galactosämie [3] ist eine gestörte Synthese von Galactolipiden, die erst nach der Geburt erfolgt [22], aus UDP-Galactose [45], das aber vom Galactosämiekranken nur aus UDP-Glucose gebildet werden kann [45]. Die UDP-Glucose Pyrophosphorylase wird jedoch bei erhöhten Galac-

tose-1-Phosphat-Spiegeln gehemmt [13, 44], wobei ein Verhältnis von Galactose-1-Phosphat zu Glucose-1-Phosphat von 50:1 (diese Bedingungen kommen in unbehandelter Galactosämie vor) eine 50 %-ige Hemmung der UDP-Glucose Pyrophosphorylase hervorruft [65].

Warum nimmt die Galactose-1-Phosphat Konzentration in Geweben und Zellen von Galactosämiekranken nach längerdauernder Galactoseexposition wieder ab? Wird dabei ein alternativer Weg induziert [67], oder verarmt die Zelle als Folge einer frustranen zyklischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Galactose [17, 51, 52, 64] an ATP, dem Substrat der Galactokinase?

Es wurde auch ein protektiver Effekt von Glucose diskutiert [67]. Zellen zeigten nach einer initialen Wachstumshemmung ein annähernd normales Wachstumsverhalten, wenn das Kulturmedium außer Galactose auch Glucose enthielt [53, 54, 60]. Dieser Effekt könnte durch eine Limitierung der Galactose-1-Phosphat Bildung aus UDP-Galactose durch UDP-Glucose bedingt sein [27].

Auch eine Konkurrenz von Glucose und Galactose um ein gemeinsames Hexose-Transportsystem wurde postuliert [5, 34, 67], nachdem die Galactose-1-Phosphat-Akkumulation in Zellen um 87 % gedrosselt wurde, wenn gleichzeitig ein 1000-facher Überschuß an Glucose bestand [67]. Andererseits war nämlich nachgewiesen, daß Glucose nicht mit Galactose in der Galactokinase-reaktion konkurriert. [37]

Es mag beunruhigen, daß selbst bei diätetisch streng behandelter Galactosämie Restsymptome auftreten, die z.T. primär durch die persistierend erhöhten Galactose-1-Phosphat-Spiegel verursacht zu sein scheinen. So wurden z.B. bei seit der Geburt behandelten Kindern im Schulalter cerebrale Schäden festgestellt, die sich als Störung der visuellen Perception manifestierten [20, 49].

1.3 Bisherige Charakterisierung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase

Ursprünglich waren UDP-Glucose Pyrophosphorylase und UDP-Galactose Pyrophosphorylase als unterschiedliche Enzyme angesehen worden [1, 41], auch Unterschiede in der Hitzeinaktivierung beider Enzymaktivitäten wiesen darauf hin [10, 100]. Zahlreiche Reinigungsversuche aus verschiedenen Geweben von Säugern, Pflanzen und niederen Organismen haben jedoch gezeigt, daß es sich wahrscheinlich um ein einziges Protein handelt. Das Verhältnis beider Aktivitäten zueinander bleibt nämlich in jeder Reinheitsstufe konstant [2, 30, 31, 48, 55, 94, 100], sogar in kristalliner Form [2, 55, 57, 94, 100]. Auch die elektrophoretische Mobilität ist identisch [10, 100], und die pH-Optima ähneln sich [2, 10]. Immunologisch handelt es sich um das gleiche Antigen [30]. Die kristalline Pyrophosphorylase aus menschlicher [100], aus Kaninchen- [99] und aus Kalbsleber [57] ist ein Octamer, bestehend aus zwei übereinanderliegenden Tetrameren mit einem Molekulargewicht der Untereinheiten von etwa 56000 bei menschlichem [100], 50000 bei Kaninchen [99] und 60000 bei Kalbsleberenzym [99]. Die Enzyme aus *Dictyostelium discoideum* [35] und *Acetabularia mediterranea* [14] wurden als Dimere mit einem MG von 55600 und 57000 bzw. 54000 pro Untereinheit beschrieben, wobei die Monomere enzymatisch inaktiv sind. Die Bildung von höheren Aggregaten wurde bei Enzymen aus Kalbs- und aus menschlicher Leber beobachtet [99]. UDP-Galactose wird als Funktion der Zahl der Untereinheiten an das Enzym gebunden [57] und kann dann stöchiometrisch durch UDP-Glucose ersetzt werden [99, 100]. Nach Ting und Hansen [94] besteht ca. 0,2 % des extrahierbaren Leberproteins (Kalb) aus Pyrophosphorylase. UDP-Galactose konkurriert also mit UDP-Glucose um den gleichen Bindungsort am Enzym, wenn auch weniger effektiv [31]. UDP-Galactose hemmt dabei kompetitiv die Pyrophosphorylase von UDP-Glucose mit einer K_i von $8,02 \cdot 10^{-4}$ [100]. Umgekehrt limitiert auch UDP-Glucose die Synthese von Galactose-1-Phosphat aus UDP-Galactose in Hämolysaten [27]. Beim Kaninchenleberenzym ist die K_i für UDP-Galactose bzw. Galactose-1-Phosphat als kompetitive Inhibitoren $2,2 \cdot 10^{-4}$ bzw. $7,3 \cdot 10^{-3}$ [99].

Das Verhältnis der Aktivitäten von UDP-Galactose- und UDP-Glucose Pyrophosphorylase ist wiederholt untersucht worden. Die Zahlenan-

gaben schwanken je nach der verwendeten Methode und dem untersuchten Material, siehe dazu Tabelle 1.

Tab. 1: Verhältnis der Aktivitäten von UDP-Galactose Pyrophosphorylase zu denen der UDP-Glucose Pyrophosphorylase

Gewebe	UDP-Galactose Pyrophosphorylase		Autor
	UDP-Glucose Pyrophosphorylase		
Menschliche Leber ¹	1	:100	[Abraham und Howell, 1]
" " 2	1	:20-30	[Gitzelmann u. Hansen, 30]
" " 2	1	:10	[Knop u. Hansen, 48]
" " 2	1	:10	[Turnquist et al., 100]
" " 2	1	:8-50	[Turnquist et al., 99]
Menschl. Erythrozyten ¹	1	:100	[Tsuboi et al., 98]
" Hautfibroblasten ²	1	:3	[Chacko et al., 10]
Kalbsleber ²	1	:70	[Ting u. Hansen, 94]
" 2	1	:28	[Albrecht et al., 2, 36]
" 2	1	:29	[Turnquist et al., 99]
" 2	1	:20-30	[Gitzelmann u. Hansen, 30]
Kaninchenleber ²	1	:7-17	[Turnquist et al., 99]
Rattenleber ¹	1	:6	[Isselbacher et al., 43]
Bifidobact. Bifidum ²	1,1:1		[Lee et al., 55]

¹ Richtung 1 ² Richtung 2 nach Gl. 1 (Seite 20)

Durch Steigerung der eingesetzten Substratkonzentrationen kann das Verhältnis zugunsten der UDP-Galactose Pyrophosphorylase verschoben werden, z.B. von 1:50 auf 1:8 [99].

Das pH-Optimum für UDP-Galactose Pyrophosphorylase wurde relativ übereinstimmend in einem Bereich zwischen pH 7,2 und 8,6 angegeben (siehe Tabelle 2).

Tab. 2: pH-Optimum für UDP-Galactose Pyrophosphorylase

	pH	
Menschliche Hautfibroblasten ²	7,3-8,6 ohne Gipfel	[10]
Menschliche Leber ¹	8,0-8,1 klarer Gipfel	[1]
Rattenleber ¹	7,2-8,0 Gipfel pH 7,6	[42]

¹, ²: Richtung 1 bzw. 2 nach Gl. 1. (Seite 20)

Diese Werte stimmen gut mit den für UDP-Glucose Pyrophosphorylase angegebenen Zahlen überein, z.B. 7,3 - 8,6 [10], ca. 7,8 [98], 7,0 - 9,0 [36] oder 7,6 - 9,2 [99].

UDP-Galactose Pyrophosphorylase ist wie UDP-Glucose Pyrophosphorylase [36] absolut von der Anwesenheit von Magnesium-Ionen abhängig. Isselbacher [42] hat angegeben, daß Konzentrationen um 10 mM optimal seien (Rattenleber). Abraham und Mitarbeiter [1] fanden maximale Enzymaktivität bei 20 mM Mg^{2+} , darüber beobachteten sie Hemmung (menschl. Leber). Für UDP-Glucose Pyrophosphorylase aus menschl. Leber wurde 3 mmol/l Mg^{2+} als am wirksamsten ermittelt, auch durch Mn^{2+} , 1 mmol/l mit 96 %, Co^{2+} , 1mmol/l mit 47 % und Ca^{2+} , 2 mmol/l mit 16 % der Aktivierung durch Mg^{2+} ließ sich ein positiver Effekt erzielen [99].

Dithiothreitol (4,65 mM) soll die Aktivität um 100 % erhöhen [1], Glutathion besitzt nur geringe Wirksamkeit [1, 42].

UDP-Galactose Pyrophosphorylase ist ein hauptsächlich cytosolisches Enzym, auch die Zellkernfraktion enthält erhebliche Aktivität, während die Mitochondrien-und Mikrosomenfraktionen nur wenig Aktivität besitzen [42]. Neuere Untersuchungen weisen UDP-Glucose Pyrophosphorylase aus menschlichen Tumorzellen als ein ausschließlich cytoplasmatisches Enzym aus [33], während UDP-Glucose Pyrophosphorylase aus Rattenleber zu 80 % im Cytoplasma und zu 20 % in der Kernfraktion zu finden sein soll [72].

Manche Autoren haben auch kinetische Daten angegeben (siehe Tabelle 3).

Tab. 3: Michaeliskonstanten (scheinbare K_m) für
UDP-Galactose Pyrophosphorylase.

Menschliche Leber [Abraham und Howell, [1]:

K_m für Gal-1-P = 1,8 mM bei 4 mM UTP

K_m für UTP = 0,8 mM bei 15 μ M Gal-1-P

Bei UTP-Konzentrationen über 4 mM tritt Hemmung auf.

Menschliche Fbroblasten [Chacko et al., 10]:

normal:

K_m für UDP-Gal = 0,37 mM bei 2 mM PPi

K_m für PPi = 0,18 mM bei 0,8 mM UDP-Gal

galactosämisch:

K_m für UDP-Gal = 0,47 mM bei 2 mM PPi

K_m für PPi = 0,22 mM bei 0,8 mM UDP-Gal

Rattenleber [Isselbacher, 42]:

K_m für Gal-1-P = 1,05 mM bei 2 mM UTP

K_m für UTP = 0,38 mM bei 0,1 mM Gal-1-P

Die Affinität der UDP-Glucose Pyrophosphorylase aus Kaninchenleber zu UDP-Galactose wurde mit einem K_m = 0,42 mM angegeben [99].

Das Enzym ist bei +5°C relativ und bei -20°C sehr stabil, wobei der Aktivitätsverlust bei +5°C ca. 1,5 % pro Stunde betrug [1]. Der für die Stabilität der UDP-Glucose Pyrophosphorylase aus Kalbsleber günstigste pH liegt bei 9,0-9,8 [36].

Versuche zur Genkartierung haben ergeben, daß beim Menschen zwei molekulare Formen der UDP-Glucose Pyrophosphorylase existieren, wobei die Form 1 dem Chromosom Nr. 1 [9] und die Form 2 dem Chromosom Nr. 2 [88] zuzuordnen ist.

Auch bei der Ratte werden zwei Formen der UDP-Glucose Pyrophosphorylase vermutet, von denen die eine durch Co^{++} -Ionen aktivierbar ist, die andere jedoch gehemmt wird [72].

Über die Regulationsmechanismen der UDP-Glucose Pyrophosphorylase-Aktivität in Zellen von Säugetieren liegen bisher kaum Angaben vor. Bei primitiven Eukaryonten (*Dictyostelium discoideum*) scheinen jedoch Proteasen im Spiel zu sein. Tosyl-Lysin-Chloromethyl-Keton, ein irreversibler Inhibitor verschiedener Serin- und Sulfhydrylproteasen, steigert die Stabilität und die spezifische Aktivität des Enzyms in Zellhomogenaten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [12].

1.4 Fragestellung

Diese Untersuchung versucht folgende Fragen abzuklären:

Warum entwickeln Galactosämiekranken mit zunehmendem Alter klinisch eine gesteigerte Galactosetoleranz und erhöhte Stoffwechselkapazitäten für Galactose?

Wächst die Kapazität des dabei wirksam werdenden alternativen Stoffwechselweges durch Aktivitätszunahme eines einzigen Isoenzym oder ändert sich nur das Aktivitätsverhältnis evtl. existierender Isoenzyme der UDP-Galactose Pyrophosphorylase?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde das Enzym UDP-Galactose Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.10) bezüglich seiner Kinetik, der spezifischen Aktivität und des Isoenzymmusters an menschlichen Geweben studiert. Die Untersuchungen wurden an verschiedenen Organen fetaler und erwachsener Individuen sowie an Blutproben Galactosämiekranker und normaler Kontrollen durchgeführt.

Außerdem konnte ein Beitrag zu der Diskussion um die Identität von UDP-Glucose- und UDP-Galactose Pyrophosphorylase geleistet werden.

2. MATERIAL

2.1 Gewebe- und Blutproben

Relativ frische autoptische Präparate normaler menschlicher Organe erhielten wir vom Institut für gerichtliche Medizin der Universität München. Das Alter der Individuen lag zwischen 3 und 62 Jahren, wobei nur Proben von Menschen verwendet wurden, bei denen keine Stoffwechselkrankheit bekannt war und eine unnatürliche Todesursache vorlag. Die Zeit zwischen dem Eintritt des Todes und der Probenentnahme betrug nur etwa 6 bis 9 Stunden.

Die II. Frauenklinik der Universität München überließ uns freundlicherweise Feten im Gestationsalter von 15 bis 22 Wochen nach legalem mit Prostaglandin durchgeführtem Schwangerschaftsabbruch.

Blutproben von normalen Kontrollpersonen stammten zum Teil aus freiwilligen Blutspenden des Personals der von Haunerschen Kinderklinik der Universität München, die übrigen kamen von routinemäßigen Blutentnahmen bei Patienten des gleichen Hauses.

Galactosämieblut erhielten wir vom Stoffwechsellabor derselben Klinik, die ständig galactosämiekranken Patienten überwacht.

Allen Mitarbeitern aus den genannten Instituten, die unser Projekt unterstützt haben, sei hiermit unser verbindlicher Dank ausgedrückt.

2.2 Chemikalien und Biochemica

Radioaktive Verbindungen wurden von Amersham Buchler, Braunschweig bezogen: α -D-[U- ^{14}C]Galactose-1-Phosphat, α -D-[U- ^{14}C]Glucose-1-Phosphat, Uridin Diphospho-D-[^{14}C]Galactose und Uridin Diphospho-D-[^{14}C]Glucose.

Sigma Chemie, München, lieferte die meisten Substrate: Galactose-1-Phosphat, UDP-Galactose, UTP (Uridintriphosphat), Pyrophosphat, DTT (Dithiothreitol), NADP (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat), MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) und PMS (Phenazinmethosulfat).

Enzyme und einige Chemikalien kamen von Boehringer Mannheim: Glucose-1,6-diphosphat, Glucose-1-Phosphat, UDP-Glucose, β -Galactose Dehydrogenase, Alkalische Phosphatase, Phosphoglucomutase.

Im übrigen wurden Chemikalien von Merck, Darmstadt, verwendet.

Die Chemikalien für die Isoelektrofokussierung kamen von LKB-Produkten AB, Bromma, Schweden.

Andere Hilfsmittel:

DEAE-Cellulose, Anionenaustauscher, Kapazität: 0,90 meq/gm, fine (Sigma Chemie).

Szintillator: Quickszint 402, Fluoreszenzmaximum: 415 nm (Zinsser, Frankfurt)

Dialysierschläuche: Dialysis Tubing-Visking, Größe 1-8/32" (Medicell International LTD, London).

Flüssigkeitsszintillationszähler: Searle Analytic Inc., Modell 115

Trennkammer und Stromversorgung für die Elektrofokussierung: Pharmacia.

3. METHODIK

Im folgenden Abschnitt sollen die in dieser Studie zur Anwendung gekommenen biochemischen Methoden erläutert werden. Zum besseren Verständnis wird jeweils eine kurze theoretische Einführung vorangestellt.

3.1 Enzymaktivitätsmessung

Die Aufgabe bestand darin eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, in verschiedenen Organen spezifische Aktivitäten zu bestimmen und vor allem enzymkinetische Studien durchzuführen.

Andere Autoren haben bereits sowohl photometrische als auch Isotopenmethoden angegeben, das Hauptproblem bei den letzteren bestand jedoch in der Trennung von Produkten und Substraten, die sich umständlich und zeitraubend gestalten.

3.1.1 Probenvorbereitung

- Präparation der Gewebshomogenate

Frische Stücke von Leber, Muskel (M. psoas), Niere und Großhirn (Rinde von Mark bei beiden Organen nicht getrennt) wurden nach der Autopsie sofort bei -22°C tiefgefroren. Die Feten (16.-22. SSW) wurden sofort bei $+3^{\circ}\text{C}$ sezirt und deren Organe ebenfalls tiefgefroren. Kurz vor der Weiterverarbeitung, die innerhalb von maximal vier Wochen erfolgte, wurden die zerkleinerten Gewebsteile unter Eiskühlung in einem Potter Elvehjem Homogenisator mit 4 Teilen¹ 1 mmol/l EDTA-Puffer, pH 7,0 und einem Zusatz von 0,01 mol/l MgCl_2 homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate 20 min lang bei 10000 g zentrifugiert und die Überstände dialysiert (siehe unten).

¹ Ausnahme: Gehirn wurde mit nur 1,5 Teilen Puffer homogenisiert.

Die Ansätze für die Bestimmung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase, Richtung 1 (siehe Gl. 1, Seite 20) enthielten in der Endverdünnung gewöhnlich etwa folgende Proteinmengen (in mg/ml):

Tab. 4: Protein im Testansatz für UDP-Galactose Pyrophosphorylase (modifizierte Methode nach Lowry) in mg/ml.

Organ	adult	fetal
Leber	0,2	2
Hirn	2	3
Niere	4	3
Muskel	3	2

Ansätze für UDP-Galactose Pyrophosphorylase, Richtung 2 nach Gl. 1 (Synthese von Galactose-1-Phosphat), enthielten nur etwa den 8. Teil der oben angegebenen Proteinkonzentrationen, solche für UDP-Glucose Pyrophosphorylase nur den 40. Teil.

- Zur Proteinbestimmung diente die Methode nach Lowry [61] in der in unserem Laboratorium abgewandelten Form [84] mit Rinder-serumalbumin als Standard.
- Präparation der Hämolyse

Aus frischen heparinisierten Vollblutproben wurden die Erythrozyten abzentrifugiert, zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, anschließend durch Einfrieren und Auftauen hämoly-siert, mit 5 Teilen Aqua bidest verdünnt und zuletzt dialysiert (siehe unten). Wenn die Proben nicht sofort verarbeitet werden sollten, wurden die gewaschenen und eingefrorenen Erythrozyten bei -22°C aufbewahrt und dann wie oben beschrieben weiterbe-handelt.

Die Ansätze für UDP-Galactose Pyrophosphorylase enthielten ca. 2 g Hämoglobin/100 ml bei fetalem Blut.

Die Hämoglobinnmessung erfolgte nach der Cyanhämoglobin-Methode bei 455 nm.

Um mögliche Interferenzen von in der Probe enthaltenen Substraten, Produkten und anderen Metaboliten oder Ionen mit der Aktivitätsmessung auszuschalten, wurden diese kleinen Moleküle durch Dialyse aus den Proben entfernt.

- Zur Dialyse wurden Dialysierschläuche der Größe 1-8/32" verwendet. Das Dialysierbad enthielt in destilliertem Wasser 0,01 M $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA und 5 mM Tris und wurde mit HCl auf pH 8,0 titriert. Etwa 10 ml Probe wurden dreimal 45 min in je 5 l Badelösung unter ständigem Rühren der Lösung dialysiert, dabei hatte das Bad ständig eine Temperatur von +3°C.

3.1.2 Isotopenmethode

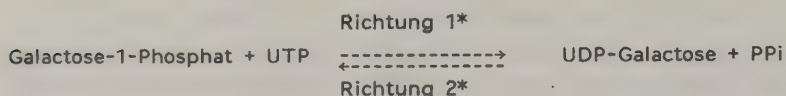
Die hier verwendete Isotopenmethode ist eine mit diskontinuierlichen Messungen arbeitende Stichprobenmethode, die einen über die Zeit linearen Reaktionsablauf voraussetzt, da es hier, im Gegensatz zu photometrischen Methoden, nicht möglich ist, die Anfangsgeschwindigkeit einer Reaktion direkt zu verfolgen. Die entscheidenden Vorteile dieses Verfahrens, das Radioisotope als Tracer verwendet, liegen zum einen in ihrer sehr hohen Empfindlichkeit, zum anderen in der Einfachheit.

Die hohe Sensibilität ist wichtig für die Messung eines Enzyms mit niedriger spezifischer Aktivität in Rohextrakten und liegt in der sehr niedrigen Nachweisbarkeitsgrenze radioaktiv markierter Substanzen begründet. Die Methode ist dabei einfach in ihrer Ausführung, weil außer markiertem Substrat, Puffer und Magnesiumionen keine weiteren Substanzen oder Hilfsenzyme am Reaktionsablauf beteiligt sind. Der Verzicht auf Hilfsreaktionen erhöht gleichzeitig die Spezifität.

Das Hauptproblem bestand bisher in der quantitativen Trennung markierter Substrate von den Produkten. Durch die Anwendung von Mini-Chromatographiesäulen mit DEAE-Cellulose als Anionenaustauscher kann diese Trennung in einem einfachen Arbeitsgang durchgeführt werden, der die Verarbeitung großer Probenzahlen ermöglicht.

3.1.2.1 Prinzip der Isotopenmethode für UDP-Galactose Pyrophosphorylase

Das Enzym katalysiert folgende Reaktion



Gl. 1

D-Galactose-1-Phosphat kann ohne Beeinflussung des Reaktionsablaufs durch α -D-[U- ^{14}C] Galactose-1-Phosphat ersetzt werden, bei dem ein Kohlenstoffatom des Zuckergerüsts gegen das radioaktive Isotop ^{14}C substituiert ist. Das markierte Galactose-1-Phosphat und alle Metabolite davon, die das schwere Isotop enthalten, können mittels eines Szintillationszählers quantitativ nachgewiesen, aber nicht differenziert werden. Die Aufgabe besteht darin, einen Ansatz zu finden, in dem die Reaktion unter möglichst optimalen Bedingungen ablaufen kann, ohne daß das Substrat oder das Produkt in nennenswertem Umfang außerhalb der beobachteten Reaktion weitermetabolisiert werden. Nach einer ausreichenden, definierten Inkubationszeit bei einer genau einzuhaltenen Temperatur wird die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms gestoppt. Während der gewählten Inkubationszeit muß die Reaktion mit gleichbleibender Geschwindigkeit ablaufen, d.h. über die Zeit linear. Um dies zu erreichen, dürfen sich die Konzentrationen der Reaktionspartner nicht verändern. In der Praxis wird dies dadurch annähernd erreicht, daß die Reaktion spätestens dann abgebrochen wird, wenn maximal 10 % des Substrates umgesetzt sind. Beim Stoppen muß das Enzymprotein sehr rasch denaturiert werden, damit das Ende der Reaktion genau festgelegt werden kann und sich Produkte und Sub-

* Diese Terminologie ist willkürlich gewählt und soll der Vereinfachung dienen.

strate vom Enzymprotein ablösen. Nach dem Entfernen der denaturierten Proteine lassen sich mit Hilfe der Säulenchromatographie Substrate und Produkte quantitativ trennen und anschließend durch Flüssigkeitszintillationszählung messen.

3.1.2.2 Ausführung der Isotopenmethode, Meßansätze

Die Aktivität der UDP-Galactose Pyrophosphorylase wurde durch die Beobachtung zweier Reaktionen bestimmt; einmal durch die Synthese von UDP-Galactose aus Galactose-1-Phosphat und UTP (Richtung 1), andererseits aus der Synthese von Galactose-1-Phosphat aus UDP-Galactose und Pyrophosphat (Richtung 2). Alle Ansätze wurden als Mikromethode in Eppendorf-Reaktionsgefäßen ausgeführt. Die Reaktion wurde jeweils durch Einpipettieren von 50 µl Probe (Gewebeextrakt oder Hämolysat) in ein vorgelegtes Volumen von 100 µl Reaktionsgemisch gestartet. Bis zum Starten blieben die Proben eisgekühlt. Nach dem Mischen wurden die Ansätze sofort auf +37°C temperiert. Dazu diente ein thermostatgesteuerter Aluminiumblock mit Bohrungen für 200 Eppendorfgefäße. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Gefäße zum Stoppen 4 min lang in einen auf 95°C vorgeheizten Eppendorf-Thermoblock gebracht und dann im Eisbad abgekühlt. Das hitzedenaturierte Protein ließ sich nun durch Abzentrifugieren aus den Ansätzen entfernen, während die Überstände weiter analysiert wurden.

Die Reaktionsgemische enthielten in 100 µl Volumen:

UDP-Galactose Pyrophosphorylase, Richtung 1:

150 nmol (0,1 µCi) [14C]-Galactose-1-Phosphat, 200 nmol UTP, 10 µmol Tris-Cl-Puffer, pH 7,9, 1 µmol MgCl₂ und 0,5 µmol Dithiothreitol. Inkubation: 2 h bei 37°C.

UDP-Galactose Pyrophosphorylase, Richtung 2:

Galactose-1-Phosphat und UTP wurden ersetzt durch:

150 nmol (0,075 µCi) UDP [14C]-Galactose, 200 nmol anorganisches Pyrophosphat. Inkubation: 30 min - 1 h bei 37°C.

UDP-Glucose Pyrophosphorylase, Richtung 1:

300 nmol (0,05 μ Ci) [14 C]-Glucose-1-Phosphat, 300 nmol UTP; die übrigen Reagentien wie oben.

UDP-Glucose Pyrophosphorylase, Richtung 2:

300 nmol (0,05 μ Ci) UDP [14 C]-Glucose, 300 nmol anorganisches Pyrophosphat statt Glucose-1-Phosphat und UTP. Inkubation für beide Richtungen: 30 min bei 37°C.

Es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Reaktionsgemische enthielten Magnesiumchlorid, weil beide Enzymaktivitäten von der Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen absolut abhängig sind [42]. Die optimale Mg^{2+} -Konzentration soll bei 0,02 M liegen [1], darüber soll Hemmung auftreten [1].

Das Reduktionsmittel DTT soll oxidierte Disulfidbrücken im Enzymprotein wieder reduzieren und so das Enzym renaturieren [1].

- Leerwerte

Für die Richtung 1 beider Enzyme wurden je zwei verschiedene Leerwerte verwendet; einer, bei dem der Extrakt vor Zugabe des Reaktionsgemisches durch Heizen auf 95°C für 5 min denaturiert wurde (geheizter Leerwert), ein zweiter, bei dem UTP durch destilliertes Wasser ersetzt war (UTP-Leerwert). In der Richtung 2 konnten nur geheizte Leerwerte ermittelt werden, weil sich herausstellte, daß UDP- 14 C]-Galactose und -Glucose in Abwesenheit von Pyrophosphat (zweites Substrat) nicht ausreichend stabil sind. Allen Berechnungen der Richtung 1 wurden Leerwerte ohne UTP zugrundegelegt.

- Kinetische Studien

Wie bereits erwähnt, wird hier die Konzentration des ersten Substrates variiert und die des zweiten konstant gehalten. Der Variationsbereich soll dabei nach Möglichkeit die Gegend der Michaeliskonstante einschließen. In dieser Arbeit wurde die Richtung 1 der UDP-Galactose Pyrophosphorylase-Reaktion für beide

Substrate untersucht. Die K_m -Werte für Galactose-1-Phosphat wurden durch Aktivitätsmessungen bei Gal-1-P Konzentrationen von 16, 8, 4, 2, 1 und 0,5 mmol/l und einer konstanten UTP-Konzentration von 1,3 mmol/l ermittelt. Zur Bestimmung der Werte für UTP wurden 1,3, 0,67, 0,27, 0,13, 0,07 und 0,04 mmol UTP/l bei einer konstanten Gal-1-P Konzentration von 1,0 mmol/l eingesetzt. Die Menge der eingesetzten Radioaktivität war in allen Ansätzen gleich. Für jeden untersuchten Fall wurden die Lineweaver-Burk-Diagramme gezeichnet [58] und daraus die kinetischen Charakteristika abgeschätzt, wobei die Diagramme nach Dixon und Webb [15] analysiert wurden. Zur Interpretation von Lineweaver-Burk-Diagrammen siehe 4.1, 4.2.1, 4.3.1. Die Aktivität der Galactose-1-P Uridyltransferase wurde nach der bereits früher beschriebenen Methode bestimmt [83, 86].

3.1.3 Säulenchromatographie

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß der Szintillationszähler nicht zwischen markierten Substraten und Produkten diskriminieren kann. Deshalb müssen vor der Zählung Substrat und Produkt getrennt werden. Zur Trennung von Monophosphaten (Galactose-1-Phosphat, Glucose-1-Phosphat) und Pyrophosphaten (UDP-Galactose, UDP-Glucose) bietet sich die Ionenaustauscherchromatographie an.

Das hier beschriebene Verfahren wurde bereits bei der Messung von Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase verwendet [86].

3.1.3.1 Anionenaustauscherchromatographie mit DEAE-Cellulose auf Mini-Säulen

Prinzip

In dieser Studie wird die Säulenchromatographie mit DEAE-Cellulose als Anionenaustauscher in ihrer Chlorid-Form benutzt. Die Verwendung dieses Verfahrens macht die interkurrente Dephosphorylierung der Monophosphate durch alkalische Phosphatase überflüssig.

Im ersten Schritt können die Chlorid-Ionen der Cellulose bei geeignetem pH gegen Phosphat ausgetauscht werden. Die markierten Substrate

und Produkte - beides Phosphate - werden somit nebeneinander an die feste Phase gebunden. Im zweiten Schritt werden die Phosphate durch fraktionierte Elution mit Salzsäure wieder in die flüssige Phase überführt, wobei sich der Austauschvorgang umkehrt. Die Trennung von Mono- und Pyrophosphaten wird dadurch ermöglicht, daß Mono- und Pyrophosphate in saurem pH unterschiedliche Dissoziationskonstanten besitzen [70]. Monophosphate lassen sich bereits bei geringeren HCl-Konzentrationen vom Träger verdrängen als Diphosphate.

Es sind also folgende Arbeitsgänge nötig:

- Zuerst wird die mit vorbereiteter Cellulose gepackte Säule mit einer HCl-Lösung äquilibriert, deren Konzentration die Bindung beider Phosphate begünstigt.
- Nach dem Auftragen der Probe auf die Säule erfolgt die Bindung der in der Probe enthaltenen Substrate und Produkte an die Cellulose.
- Durch Eluieren mit schwacher Salzsäure werden die Monophosphate in die flüssige Phase aufgenommen und verlassen die Säule.
- Die jetzt noch in der Säule enthaltenen Diphosphate werden mit stärkerer Salzsäure ebenfalls eluiert.
- Beide Fraktionen können nun getrennt von einander auf ihren Radioaktivitätsgehalt untersucht werden.

3.1.3.2 Ausführung mit Mini-Säulen

Durch das Arbeiten mit einer Mikromethode kann die erforderliche Kapazität der Säulen und damit ihr Volumen sehr klein gehalten werden.

Herstellung der Säulen: Aus Einmalspritzen von 2 ml Volumen wird der Stempel entfernt und der Boden der so entstandenen "Säule" mit Glaswolle ausgestopft, so daß eine höchstens 1 mm dicke Schicht entsteht, die die Cellulose zurückhält. Dann wird die Säule in einen Ständer gestellt und bis zur 1 cm³-Marke mit DEAE-Cellulose, Cl⁻-Form gepackt.

Herstellung der Cellulose: Etwa 200 g trockene DEAE-Cellulose werden in einem großen Becherglas [5 l] mit destilliertem Wasser aufgeschwemmt und gut durchgerührt. Die Cellulose sedimentiert nach einiger Zeit, während die Feinpartikel langsamer sinken. Diese können dekantiert oder abgesaugt werden. Durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. werden die überschüssigen Feinpartikel entfernt. Die OH^- -Form entsteht durch Rühren der Cellulose in 1N NaOH für 60 min. Die Cellulose wird anschließend solange mit Aqua dest. gewaschen, bis der Überstand neutral reagiert (pH 7). Durch Rühren in 100 mM HCl für 60 min läßt sich jetzt die OH^- -Form in die Cl^- -Form überführen. Diese wird dann wieder mit Aqua dest. gewaschen bis der Überstand pH 7 aufweist. Die sedimentierte Cellulose ist in dieser Form bei +4°C über Monate haltbar.

Lauf der Säulen: Jede Säule wird mit 2,5 ml HCl, 20 mM äquilibriert. Nach dem Abtropfen werden auf jede Säule vorsichtig je 100 µl Probe aus dem Überstand des geheizten und zentrifugierten Testansatzes aufgetragen. Wenn die Proben vollständig eingezogen sind, läßt sich zuerst das Galactose-1-Phosphat mit 7,5 ml HCl, 20 mM (1,0 + 2,5 + 2,5 + 1,5 ml), und anschließend die UDP-Galactose mit 2,5 ml HCl, 150 mM (2 · 1,25 ml) eluieren. Die Eluate können fraktioniert aufgefangen werden. Dasselbe Verfahren kommt auch bei der Trennung von Glucose-1-Phosphat und UDP-Glucose zur Anwendung. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Säulen für alle Tests nach diesem Schema eluiert.

Abb. 3 veranschaulicht die Trennungseigenschaften der Mini-Säulen, wie sie im Modellversuch ermittelt wurden.

Versuchsordnung: Durch zweckmäßige Anordnung der Säulen können über 100 Proben gleichzeitig verarbeitet werden. Hier wurde die in Abb. 2 dargestellte einfache Vorrichtung benutzt (s. Abb. 2)

Die Säulen wurden in ein Gestell eingehängt, unter dem ein Träger mit Szintillationsgefäßen geschoben war (Packard). Die Eluate konnten direkt in den Zählfläschchen gesammelt werden.

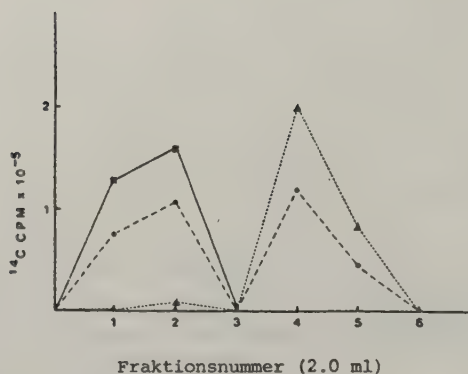


Abb 3: Elutionsmuster der Mini-Säulen. —■—, 0,2 μCi [^{14}C] Galactose-1-Phosphat (348 mCi/mmol); ---●---, 0,2 μCi [^{14}C] Uridin Diphosphat Galactose (200 mCi/mmol); ...▲..., Mischung aus 0,1 μCi [^{14}C] Galactose-1-Phosphat und 0,1 μCi [^{14}C] Uridin Diphosphat Galactose auf einer DEAE-Cellulose Säule. Säulengröße: 0,8 cm x 1,6 cm. Fraktionsgröße: 2,0 ml. Die Fraktionen 1-3 sind mit 20 mM HCl, die Fraktionen 4-6 mit 100 mM HCl eluiert.

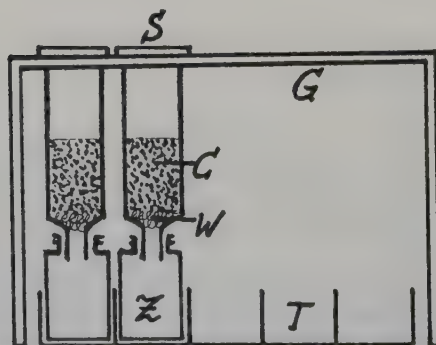


Abb 2: Versuchsanordnung-mit Mini-Säulen
 G: Gestell, T: Träger für Zählfläschchen,
 Z: Zählfläschchen, S: Säule, W: Glaswolle, C: Cellulose

3.1.4 Flüssigkeitsszintillationszählung

Ausführung: Im Routinebetrieb wurde zur Analyse der Richtung 1 der Enzymreaktionen das letzte Eluat aus der Säulenchromatographie (2,5 ml HCl, 150 mM) direkt in einem Einmal-Zählgefäß aufgefangen. Nach Zugabe von 16 ml Szintillator wurde das Gefäß dicht verschlossen und kräftig geschüttelt. Der Inhalt mußte nun klar und durchscheinend sein. Bei der Untersuchung der Richtung 2 mußten 2 ml aus den insgesamt 7,5 ml des ersten Eluates (20 mM HCl) in ein neues Gefäß umpipettiert werden, bevor der Szintillator zugegeben werden konnte (die Löslichkeit wässriger Proben im Szintillator ist begrenzt). Jedes Vial wurde 5 min gezählt. Die mit Hilfe eines "internal standard" bestimmte Ausbeute lag hier zwischen 85 und 90 %.

Würden die so gemessenen Zählraten, die dem Substratumsatz während der Inkubationszeit proportional sind, bei der Berechnung der Enzymaktivität auf die tatsächlich eingesetzte Radioaktivität bezogen, so entstünde ein Fehler, der durch die Bildung von experimentellen 100 %-Werten vermieden werden kann. Dieser "external Standard" muß für jede Serie neu bestimmt werden und entsteht dadurch, daß 100 µl aus einem gestoppten und zentrifugierten Testansatz nicht auf der Säule getrennt, sondern unter den gleichen Bedingungen wie die Eluate direkt gezählt werden. Vor Zugabe des Szintillators werden die 100 µl Überstand mit entsprechend konzentrierter HCl auf das gleiche Volumen und den gleichen pH wie die Eluate gebracht.

In der Praxis kann so verfahren werden, daß zu diesem Zweck kein besonderer Testansatz verwendet wird, sondern daß die Probe aus einem Pool von Überständen stammt (von 150 µl pro Probe werden nur 100 µl für die Säule benötigt).

Der Berechnung des Substratumsatzes wurde in allen Fällen ein Mittelwert aus mindestens drei so entstandenen Werten zugrundegelegt, deren Variationsbreite unter 1 % betrug.

3.1.5 Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivität wird in nmol pro Minute und mg Protein im Ansatz ausgedrückt. Beim Erythrozytenenzym wird die Einheit μmol pro Stunde und g Hämoglobin im Ansatz benutzt (nmol/min. mg Protein bzw. $\mu\text{mol/h. g. Hb}$).

Der Substratumsatz wird als Relativwert ($\%$ des markierten Substrates) im Vergleich zu einem 100 $\%$ -Wert registriert (siehe "Flüssigkeitsszintillationszählung"). Zusammen mit der eingesetzten absoluten Substratmenge errechnet sich daraus die Absolutmenge des umgesetzten Substrates in der definierten Inkubationszeit (nmol/min bzw. $\mu\text{mol/h}$). Dieser Wert wird in Beziehung gesetzt zu der gemessenen Proteinmenge bzw. Hämoglobinmenge im Ansatz, woraus dann die spezifische Aktivität resultiert (siehe oben).

3.2 Isoelektrische Fokussierung, Ausführung in Flachbettmedien [Literatur: siehe LKB, 59]

Elektrofokussierung ist eine hochauflösende Technik zur Analyse von Proteinen aller Art. Die Proteine werden aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte (pI) durch Wanderung in einem pH-Gradienten getrennt, der unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes von Trägerampholyten aufgebaut wird. Jedes Protein wird aktiv an seinem pI fokussiert, so daß eine sehr hohe Auflösung erzielt werden kann. Es ist möglich, zwei Proteine mit einer pI-Differenz von nur 0,0025 pH-Einheiten zu trennen.

Um die optimalen Bedingungen für die isoelektrische Fokussierung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase herauszufinden, mußten zuerst Vorversuche durchgeführt werden. Diese Vorversuche wurden z.T. auf Polyacrylamid-Gel mit teilweise gereinigten Leberextrakten (3.3.1) als Probe gemacht. Agarose-Gele erwiesen sich als geeignetes Medium wegen des hohen Molekulargewichts des Enzyms. Agarose-Gele eignen sich u.a. zur Analyse sehr großer Proteine mit einem MG bis zu 2 Mio Dalton. Nach einem Experiment mit einem breiten pH-Bereich der Trägerampholyte (pH 3,5 - 9,5) konnte ein engerer Bereich mit höherer Auflösung gewählt werden. Es wurden verschiedene Auftragsstellen, verschiedene Filterpapiersorten zum Probenauftrag, unterschiedliche Laufzeiten und elektrische Parameter getestet und die jeweils günstigsten ermittelt. Nach den Experimenten wurde der pH des Gradienten in 1 cm-Abständen gemessen, wozu Gelstreifen aus jeder Zone ausgeschnitten und in destilliertem Wasser geschüttelt wurden.

3.2.1 Probenvorbereitung für die IEF

Die Proben zur isoelektrischen Fokussierung wurden in prinzipiell gleicher Weise wie die Proben für die Enzymaktivitätsmessung homogenisiert bzw. hämolysiert und anschließend dialysiert. Im Unterschied zur bereits beschriebenen Methode wurden die Gewebeproben so konzentriert wie möglich homogenisiert, was zu etwa doppelt so konzentrierten Gewebsextrakten führte. Die Hämolysate aus Erythrozyten wurden unverdünnt eingesetzt. Das letzte Dialysierbad bestand aus reinem destilliertem Wasser, um Interferenzen von Ionen mit der für Salze sehr empfindlichen IEF zu vermeiden. Partiiell gereinigte Proben hätten demgegenüber den Nachteil, daß das Enzym in ihnen einerseits schon teilweise inaktiviert wäre, andererseits das Isoenzymmuster durch den Reinigungsvorgang verändert sein könnte und demzufolge möglicherweise verfälschte Bandenmuster registriert würden.

3.2.2 Gießen der Gele (AGIF)

Zuerst wurde die Gießform vorbereitet. Sie bestand aus zwei Glasplatten, die durch eine umlaufende Gummidichtung in einem gleichbleibenden Abstand von 1 mm gehalten wurden, und wies seitlich eine Einfüllöffnung auf. Auf eine der Glasplatten war eine Trägerfolie (LKB Gelbond-Folie 1850-101) mit ihrer hydrophoben Seite aufgewalzt (Haftung auf der Glasplatte durch einige Tropfen Wasser), während die hydrophile Seite der Kunststoffolie zum Lumen der Form zeigte und später das Gel tragen sollte. Diese Form wurde 15 min vor dem Gießen auf eine Temperatur von 65°C gebracht.

Die Agarose (LKB Isogel Agarose EF 2206-111) wurde durch Erhitzen im Wasserbad auf 95°C unter ständigem Rühren in Aqua bidest. völlig aufgelöst. Nach dem Abkühlen der glasklaren und blasenfreien Lösung auf 70°C wurden die Ampholine^R unter fortgesetztem Rühren zugegeben. Dieses noch flüssige Medium wurde sofort mit Hilfe einer ebenfalls vorgewärmten Spritze und einem dünnen Kunststoffschlauch (Venenkatheter) blasenfrei in die schwach geneigte Form (ca. 30°C zur Horizontalen) eingefüllt. Nach dem Verschließen der Form wurde diese sofort in die Horizontallage gebracht und blieb eine Stunde lang so liegen.

Nach dem Erkalten konnte das nun fest auf der Trägerfolie haftende Gel aus der Form genommen werden und blieb bis zum Gebrauch, mindestens jedoch 2 Stunden, bei +3°C in einer Feuchtkammer (LKB 2117-110). Hier entwickelte das Gel seine endgültige Festigkeit.

Ein Gel der Größe 240 mm x 120 mm x 1mm mit 1 % Agarose und 3,5 % Ampholinen^R enthielt:

0,33 g Isogel Agarose EF

20,2 ml Aqua bidest.

2,9 ml Ampholine^R, 40 %-ig.

Die besten Ergebnisse wurden mit Ampholinen^R des pH-Bereichs 5-8 erzielt (LKB 1818-126). Auch ein Ampholine^R-Gemisch pH 4-6 und 5-8, je 2 %-ig, war gut geeignet, wenn als Anodenlösung 0,5 M Essigsäure gewählt wurde. Für die Vorversuche mit PAGIF wurden handelsübliche Polyacrylamid-Gele benutzt (LKB).

3.2.3 Lauf (AGIF)

Das Gel wurde noch in der Feuchtekammer liegend für 10 min mit einem Blatt Whatman 1 MM Filterpapier getrocknet und dann auf die Kühlplatte der Trennkammer gelegt. Einprozentiges Tritonwasser zwischen Kühlplatte und Trägerfolie sorgte für intensiven Kontakt und eine gute Wärmeleitung. Die Elektrodenstreifen wurden vor dem Auflegen mit den Elektrodenlösungen getränkt: 1,2 ml NaOH, 0,5 M, für die Kathode, und 2 ml Glutaminsäure, 0,04 M, für die Anode. Die Kühlwassertemperatur betrug während des ganzen Versuchs +5°C. Die Proben wurden mit Hilfe von Filterpapierstückchen (LKB) der Größe 5 x 10 mm nahe der Anode aufgetragen. Jedes Filterpapier enthielt etwa 20 µl Probe bzw. 0,3 mg Protein. Der Abstand zwischen den Auftragsstückchen betrug ca. 2 mm. Bei einer konstanten Leistung von 16 W und mit max. 20 mA und 1300 V in einer Pharmacia-Trennkammer war die Fokussierung nach einer Laufzeit von 2 h beendet. Zur Entfernung der Filterpapierstücke wurde der Lauf nach 45 min kurz unterbrochen.

Lauf bei PAGIF

Bei Gelen mit einem pH-Bereich von 3,5 bis 9,5 wurden als Elektrodenlösungen 1M Phosphorsäure für die Anode und 1M NaOH für die Kathode benutzt. Der Probenauftrag erfolgte nahe der Kathode. Die elektrischen Parameter waren (Maximalwerte) 50 mA, 1600 V und 30 W, bei einer Laufzeit von 3 h. Die Filterpapiere wurden nach etwa 30 min entfernt. Als Proben wurden ausschließlich dialysierte Ammoniumsulfatfraktionen (35 - 45 % Sättigung) eingesetzt, wobei zwischen 60 und 90 µg Protein in einem Volumen von 15 µl aufgetragen wurden. Die Kühlwassertemperatur betrug etwa 10°C.

3.2.4 Färbung

- UDP-Galactose Pyrophosphorylase

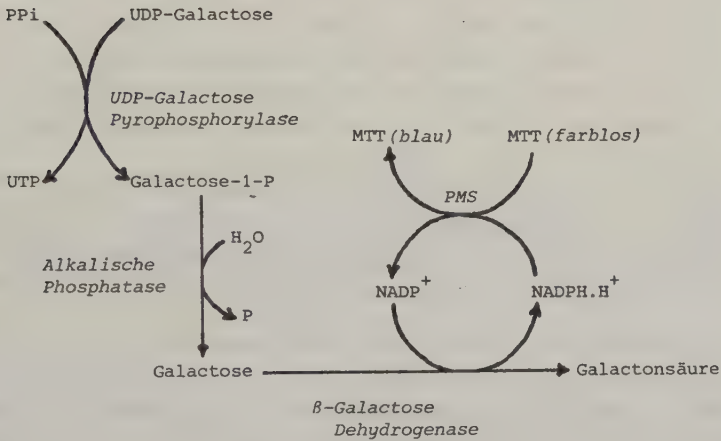
Die Methode zur Anfärbung der fokussierten Banden wurde aus dem photometrischen Ansatz für UDP-Galactose Pyrophosphorylase entwickelt und benutzt die Richtung 2 der Enzymreaktion. Diese Reaktion wurde mit der Reduktion von oxidiertem NADP^+ gekoppelt. Das entstehende NADPH.H^+ reduziert seinerseits in Anwesenheit von PMS als Elektronencarrier das farblose Thiazolylsalz MTT zu relativ unlöslichem blauem Formazan und macht so die Banden sichtbar [62].

Die Färbelösung enthält 130 mmol/l Tris-Cl-Puffer pH 8,0, 7 mmol/l MgCl_2 , 0,3 mmol/l UDP-Galactose, 1 mmol/l PPI, 1 mmol/l NADP^+ , 12,5 mg MTT, 10 µg PMS, 0,2 U β -Galactose Dehydrogenase und 1 U Alkalische Phosphatase in einem Volumen von 20 ml.

NADP, MTT, PMS und die Enzyme dürfen erst kurz vor Gebrauch zugemischt werden.

Abb. 4 zeigt schematisch den Ablauf dieser Färbereaktion.

Abb. 4: Schematische Darstellung der Färbereaktion für
UDP-Galactose Pyrophosphorylase



- UDP-Glucose Pyrophosphorylase

20 ml des Gemisches enthielten 130 mmol/l Tris-Cl-Puffer, pH 7,8, 7 mmol/l MgCl_2 , 1 mmol/l UDP-Glucose, 2 mmol/l PPi , 1 mmol/l NADP^+ , 20 $\mu\text{mol/l}$ Glucose-1,6-bis-Phosphat, 12,5 mg MTT, 10 μg PMS, 10 U Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und 10 U Phosphoglucomutase.

Dieses Gemisch leitet sich von dem Testansatz für die photometrische Messung der UDP-Glucose Pyrophosphorylase ab. Ein ähnlicher Ansatz wurde bereits von van Someren u. a. 1974 angegeben [101].

- Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase

20 ml Färbelösung enthielten 200 mmol/l Glycin-NaOH-Puffer, pH 8,7, 5 mmol/l MgCl_2 , 0,42 mmol/l UDP-Glucose, 0,84 mmol/l

Galactose-1-Phosphat, 0,79 mmol/l NADP^+ , 18 $\mu\text{mol/l}$ Glucose-1,6-bis-Phosphat, 12,5 mg MTT, 10 μg PMS, 20 U Glucose-1-Phosphat Dehydrogenase und 20 U Phosphoglucomutase.

Zur Färbung diente eine einfache Overlay-Technik: das in der Färbeschale liegende Gel wird mit einem dicken Filterpapier bedeckt (z.B. Whatman 3 MM), mit der vorgewärmten Färbelösung übergossen und im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit betrug bei Färbung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase 2 - 3 h, bei den anderen beiden Enzymen ca. 1 h.

Unmittelbar nach dem Entfernen des getränkten Filterpapiers müssen die Ergebnisse photographisch und zeichnerisch festgehalten werden, weil eine Fixierung und Haltbarmachung der mit dieser Technik gefärbten Gele leider nicht möglich ist.

3.3 Partielle Enzymreinigung

Einige Versuche wurden mit teilweise gereinigten Enzymextrakten durchgeführt, z.B. die Vorversuche zur Elektrofokussierung oder die Experimente zur Entwicklung der Färbemethode für die IEF.

3.3.1 Anreicherung von Gewebsenzymen durch Ammoniumsulfatfällung-----

Einige Gewebshomogenate (adulte und fetale Leber, adultes Gehirn) wurden durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Es kamen hierbei sehr kleine Ausgangsvolumina (5-10 ml) zur Verwendung. Die Homogenate waren entsprechend Abschnitt 3.1.1 aufbereitet und zentrifugiert, aber nicht dialysiert. Alle Arbeitsgänge fanden unter Eiskühlung statt. Die im Homogenat enthaltenen Proteine wurden durch stufenweise Erhöhung der Ammoniumsulfatsättigung fraktioniert ausgefällt. Die "Schrittweite" der Fraktionierung ist im Abschnitt "Ergebnisse" (5.1.5.1) angegeben. Bei jedem Schritt wurde das Ammoniumsulfat in Pulverform unter ständigem Rühren des Homogenats auf einem Magnetrührer vorsichtig zugegeben. Das nach dem vollständigen Lösen des Salzes (ca. 15 min) präzipitierte Protein ließ sich durch Zentrifugation bei 20.000 g für 30 min sedimentieren. Der Überstand wurde jeweils dekantiert und der weiteren Fraktionierung unterworfen. Der gleiche Arbeitsgang wiederholte sich bei jedem Schritt. Zum Schluß wurden alle Sedimente in einem minimalen Volumen Aqua bidest. gelöst und ebenso wie der letzte Überstand und eine Probe aus dem ursprünglichen Homogenat entsprechend der Vorschrift in 3.1.1 dialysiert. Selbstverständlich wurde vor der Berechnung der für eine bestimmte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung nötigen Salzmenge das Volumen des Homogenats vor jedem Schritt neu gemessen. Der Berechnung lag die Löslichkeit von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Wasser von +3°C zugrunde, die unter diesen Bedingungen 72 g/100 ml beträgt und einer 100 %-igen Sättigung entspricht. Bei jedem Schritt wurde die Salzmenge zugegeben, die der jeweiligen Differenz der Sättigungen zwischen diesem und dem vorhergehenden Schritt entsprach. Zur Analyse der Fraktionen auf Enzymaktivität diente die in 3.1 dargestellte Methode.

3.3.2 Anreicherung des Erythrozytenenzym durch Ca-Phosphat-Gel-----

Das Erythrozytenenzym der UDP-Galactose Pyrophosphorylase sowie der UDP-Glucose Pyrophosphorylase konnte durch Adsorption an Calcium-Phosphat-Gel extrahiert werden [98].

Das hierzu erforderliche Gel ist nicht kommerziell erhältlich und mußte selbst hergestellt werden [97]. Folgende Reagentien wurden dazu benötigt: 200 ml Na_2HPO_4 , 0,5 M; 6 ml conc. NH_4OH (28-32 % NH_3); 1500 ml CaCl_2 , 0,1 M. Das Dinatriumhydrogenphosphat wurde in einem 2l-Erlenmeyerkolben vorgelegt und auf einen Magnetrührer gestellt. Sofort nach der Zugabe des konzentrierten Salmiakgeists mußte mit der Calciumchloridlösung aufgefüllt und das entstandene Gel 30 min lang gerührt werden. Der pH-Wert sank dabei von ursprünglich etwa pH 7 auf ungefähr pH 6. Das freie Chlorid konnte nun durch Waschen des Gels mit destilliertem Wasser entfernt werden. Dazu wurde das Gel in einem großen Becherglas mit Aqua dest. gerührt. Nach dem Sedimentieren des Gels wurde das Wasser dekantiert und der gleiche Vorgang solange wiederholt, bis mit Silbernitrat kein Chlorid mehr im Überstand nachweisbar war. Das in 1 l Volumen resuspendierte Gel enthielt nun etwa 15 mg Trockensubstanz pro ml.

Zur Extraktion des Blutenzyms wurden frische Erythrozyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann mit 4 Teilen Aqua bidest. hämolysiert.

1. Fraktion: Im ersten Schritt wurden 20 Vol-% Gel zu dem Hämolysat gemischt und sehr gründlich gerührt (20 min). Das Gel mit den adsorbierten Proteinen konnte bei niedriger Drehzahl sehr leicht abzentrifugiert werden.

2. Fraktion: Der Überstand aus der ersten Fraktion wurde im zweiten Schritt zusammen mit weiteren 100 Vol-% Gel (bezogen auf das Ausgangsvolumen) gerührt. Auch dieses Gel wurde abzentrifugiert. Die beiden Sedimente wurden so lange mit destilliertem Wasser gewaschen bis sich keine Farbe mehr herauslöste und das Wasser völlig klar war.

Nach dem Auffüllen der Sedimente auf das ursprünglich zugegebene Gelvolumen mit Aqua bidest. ließ sich das noch gebundene Enzym durch den Zusatz des gleichen Volumens 5mM Tri-Natrium-Citrat, vollständiges Rühren und erneutes Abzentrifugieren des Gels in den Überstand eluieren. Das Eluat der ersten Gelfraktion hatte eine gelbliche, das Eluat der zweiten Fraktion eine eher rötliche Farbe. Ein Zusatz von MgCl_2 bis zu einer Konzentration von 2mM in den Eluaten sollte das Enzym stabilisieren. Die beiden Fraktionen, der Überstand und eine Probe des unbehandelten Hämolysats wurden nun einer Dialyse wie unter 3.1.1 beschrieben unterzogen.

Auch dieses Experiment wurde mit sehr kleinen Substratmengen durchgeführt. Das Ausgangsvolumen betrug hier meist etwa 2 ml unverdünnte Erythrozyten.

Das relativ große Volumen der stark verdünnten Eluate konnte entweder durch anschließendes Evaporieren in einem Rotationsverdampfer oder durch eine Ammoniumsulfatfällung der Eluate erheblich eingengt werden. Die Ammoniumsulfatfällung konnte zwar vor der Dialyse der Eluate durchgeführt werden, machte aber ihrerseits ebenfalls eine Dialyse notwendig. Wurde die Ammoniumsulfatfällung als Fraktionierung ausgeführt, so lag der Bereich der größten Anreicherung zwischen 35 und 45 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung.

Die Messung der Enzymaktivitäten in den Fraktionen erfolgte nach der unter 3.1 beschriebenen Methode, jedoch mußten die spezifischen Aktivitäten auf Protein statt auf Hämoglobin bezogen werden, weil die Gelfraktionen praktisch frei von Hämoglobin waren.

3.4 Kontrollmethoden

Einige Fragen bedurften zu ihrer Klärung zusätzlicher Tests, die zusammen mit einer kurzen Erläuterung der Fragestellung im folgenden Abschnitt dargestellt sind.

3.4.1 Spektrophotometrischer Test auf Glucose-1-Phosphat und Glucose-6-Phosphat; Messung der UDP-Glucose Pyrophosphorylase, Richtung 2-----

Diese Untersuchung war geeignet abzuklären, ob während der im radioaktiven Test verwendeten Meßreaktionen außer Glucose-1-Phosphat auch Glucose-6-Phosphat in meßbarem Umfang entsteht. Auch ein Vergleich mit den Ergebnissen der Isotopenmethode und eine Eignungsprüfung des Ansatzes als Färbemethode in der IEF war mit diesem Test möglich, der sich von einer Methode zur Glucosemessung ableitet.

Der Testablauf bestand aus zwei Schritten:

1. Herkömmlicher Test auf UDP-Glucose Pyrophosphorylase mit einem adulten Leberhomogenat als Probe.
2. Enzymatisch-photometrische Analyse der gestoppten und zentrifugierten Ansätze aus 1. auf Glucose-1-Phosphat und Glucose-6-Phosphat.

Das Gemisch zu 1. enthielt: 300 nmol UDP-Glucose, 300 nmol PPI, 1 μ mol $MgCl_2$, 0,5 μ mol DTT und 10 μ mol Tris-Cl-Puffer, pH 7,9 in einem Volumen von 100 μ l. Die Reaktion wurde durch Einpipettieren von 50 μ l Leberhomogenat und Mischen gestartet und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz durch Heizen (5 min bei 95°C) gestoppt und das denaturierte Protein abzentrifugiert. Jeder Ansatz enthielt ca. 3 μ g Protein.

Leerwerte: geheiztes Homogenat, ohne Pyrophosphat, kein Homogenat.

Zu 2. Die Überstände aus 1. wurden nun auf ihren Gehalt an Glucose-1-P und Glucose-6-P untersucht. Der Test enthielt: 50 μ l Probe (Überstand aus 1. bzw. Standard), 75 μ mol Triäthanolamin-Puffer pH 7,5, 1 μ mol MgSO_4 , 240 nmol NADP^+ , 1,8 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 2 U Phosphoglucomutase wo erforderlich in einem Gesamtvolumen von 330 μ l. Der Start erfolgte durch Zugabe des NADP^+ ; Inkubation für 30 min bei 37°C. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Extinktion bei 366 nm im Spektrophotometer bestimmt. Leerwerte: ohne PGM.

Standards: Verdünnungsreihe für Glucose-1-Phosphat; ein Kontrollwert mit 0,5 mM Glucose-6-Phosphat.

Ergebnis:

- Im Verlauf der üblichen Meßreaktion entsteht ausschließlich Glucose-1-Phosphat.
- Die spezifische Aktivität der UDP-Glucose Pyrophosphorylase in dem untersuchten Lebergewebe betrug 820 nmol/min.mg Protein und stimmt damit gut mit dem Ergebnis eines gleichzeitig durchgeführten radioaktiven Tests überein.
- Die Färbung der UDP-Glucose Pyrophosphorylase ist möglich.

3.4.2 Spektrophotometrische Messung der UDP-Galactose-Pyrophosphorylase, Richtung 2

Dieser Test entstand in dem Bemühen, eine Färbemethode für UDP-Galactose-Pyrophosphorylase in der IEF zu entwickeln. Er mußte aus diesem Grund in einem einzigen Schritt, also ohne interkurrente Enteiweißung des Ansatzes durchführbar sein. Als Probe wurde die Ammoniumsulfatfraktion zwischen 30 % und 50 % Sättigung eines adulten Leberhomogenates eingesetzt. Proteingehalt im Ansatz: 50 μ g pro Test.

Das Gemisch war wie folgt zusammengesetzt: 100 μ l Extrakt, 300 nmol UDP-Galactose, 400 nmol PPI, 500 nmol NADP^+ , 2 μ mol MgCl_2 , 40 μ mol

Tris-Cl-Puffer, pH 7,9, 0,1 U β -Galactose-Dehydrogenase und 0,6 U Alkalische Phosphatase in einem Gesamtvolumen von 305 μ l. Der Start erfolgte durch Zugabe eines Gemisches aus NADP^+ und UDP-Galactose. Die Reaktion wurde im Spektrophotometer bei 366 nm für 30 min verfolgt. Verschiedene Leerwerte wurden bestimmt.

Ergebnis:

- Die Verwendung dieses Ansatzes als Färbemethode in der IEF erscheint möglich. Der "Background" ist niedrig bei Verwendung von Leerwerten ohne UDP-Galactose.
- Die hier ermittelte Enzymaktivität stimmt gut mit Vergleichsmessungen überein, die mit der Isotopenmethode durchgeführt wurden.

4. THEORIE DER ENZYMKINETIK

Im folgenden Abschnitt sollen die theoretischen Grundlagen zur Enzymkinetik kurz dargestellt werden, soweit sie für diese Arbeit relevant sind. Diese Zusammenfassung ist als Verständnishilfe zur Interpretation der experimentellen Befunde gedacht und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

[Nach Dixon und Webb, 15]

4.1 Die Michaelis-Menten-Beziehung

Am einfachsten Fall einer Enzymreaktion liegt ein System aus einem Enzym mit je einem Substrat und Produkt vor. Die Reaktion soll frei umkehrbar sein.

Die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Gl. 2

Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt das Aktivitätsverhalten vieler Enzyme bei Änderung der Substratkonzentration.

Der K_m -Wert ist die Substratkonzentration, bei der die Enzymreaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft und besitzt die Dimension Mol/l (Definition der Michaeliskonstanten).

Zur praktischen Bestimmung von K_m und V wird die Gl. 2 in die reziproke Form umgewandelt:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

Gl. 3

Trägt man nun y oder $1/v$ als Funktion von x oder $1/[S]$ auf, dann ist b der Schnittpunkt mit der Ordinate, nämlich $1/V$, und die Stei-

gung a ist K_m/V . Setzt man $y = 0$, dann ergibt sich für den Schnittpunkt mit der Abszisse

$$x = - \frac{b}{a} = - \frac{1}{K_m}$$

Gl. 4

Doppelt reziproke Auftragung oder Darstellung nach Lineweaver-Burk [40]:

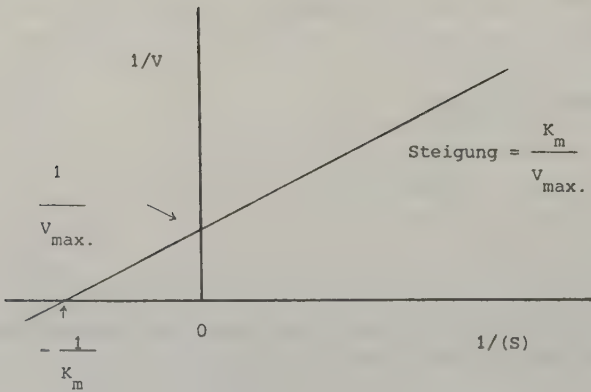
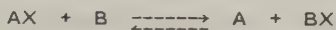


Abb. 5: Bestimmung der Enzymkonstanten nach Lineweaver und Burk

4.2 Reaktionen mit zwei Substraten

Eine Transferasereaktion könnte folgendermaßen geschrieben werden:



Gl. 5

Hierbei wird X von A auf B übertragen.

In der Gegenwart eines Enzyms gibt es eine Reihe von möglichen Reaktionsabläufen, die zu Gleichung 5 führen. Das folgende Schema veranschaulicht die wichtigsten Möglichkeiten:

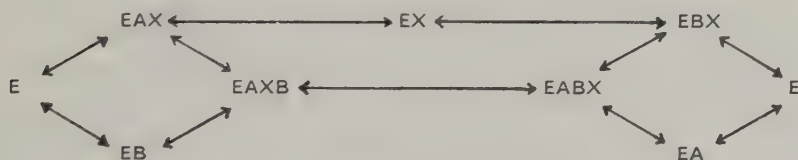
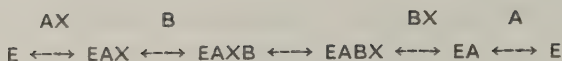


Abb. 6: Schema für Reaktionsmechanismen bei Systemen mit zwei Substraten. A, B: Donor-, Akzeptormolekül; X: übertragene Gruppe; E: Enzym.

In dem im oberen Teil des Schemas dargestellten Fall begegnen sich die beiden Substrate zu keinem Zeitpunkt als solche auf der Enzymoberfläche. Die Reaktion läuft über Komplexe des Enzyms mit jeweils nur einem Substrat- oder Produkt-Molekül sowie über einen Komplex aus der übertragenen Gruppe X und dem Enzym. Solche Komplexe werden als binäre Komplexe bezeichnet.

Das Schema enthält im unteren Teil außerdem Komplexe, in denen beide Substrate gleichzeitig an das Enzym gebunden sind, sog. ternäre Komplexe. In einem Mechanismus, der ternäre Komplexe einbezieht, können die Substrate in beliebiger Reihenfolge binden, was als Zufallsmechanismus (random-order mechanism)¹ bezeichnet wird. Dem gegenüber kann es auch eine festgelegte Reihenfolge geben, in der die Substrate an das Enzym gebunden werden:

¹ Die in Klammern stehenden Ausdrücke sind die von Dixon und Webb verwendeten Bezeichnungen [15]



Gl. 6

Dieser sog. geordnete Mechanismus (compulsory order mechanism)¹ wird auch für das Enzym UDP-Glucose Pyrophosphorylase postuliert (siehe 4.2.4).

Die allgemeine Gleichung für Reaktionen mit zwei Substraten des Typs $A + B \rightleftharpoons P + Q$ ähnelt der Gleichung für Ein-Substrat-Systeme mit dem Unterschied, daß sie für jedes Substrat eine Konstante enthält (K_m^A und K_m^B), zusammen mit einer kombinierten Konstante ($K_S^A K_m^B$).

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m^A}{a} + \frac{K_m^B}{b} + \frac{K_S^A K_m^B}{ab}}$$

Gl. 7

a und b sind die Konzentrationen der Substrate A und B; K_S ist die scheinbare² Dissoziationskonstante für das zuerst gebundene Substrat. Unter der Bedingung, daß b gegen Null geht, wird die scheinbare² Michaelis-Konstante für A zu der Konstante K_S .

Bei jeder konstantgehaltenen Konzentration eines der Substrate, z.B. B, wird durch die Variation von a eine Kurve vom Michaelis-Typ entstehen, wobei der scheinbare K_m für A von der Konzentration von B abhängt.

¹ Terminologie nach Dixon und Webb

² scheinbare (= apparent = app.)

Für sehr große Konzentrationen von B oder A (zweites Substrat) wird Gl. 7 identisch mit den Michaelis-Menten-Gleichungen für Reaktionen mit nur einem Substrat (Gl. 2). Daher kann K_m^A als die Konzentration von A bezeichnet werden, die bei einer Sättigung mit B eine halbmaximale Geschwindigkeit hervorruft; entsprechendes gilt für K_m^B . Diese Konstanten sind also echte Michaelis-Konstanten.

Die letztgenannte Bedingung dürfte in dem untersuchten System der UDP-Galactose Pyrophosphorylase für konstante UTP-Konzentrationen annähernd erfüllt sein. Die im Experiment eingesetzte UTP-Konzentration (1,3 mM) übersteigt den app. K_m für UTP (erw. Leber = 0,06 mM) um ein Vielfaches.

4.2.1 Bestimmung der individuellen Enzymkonstanten in Systemen mit zwei Substraten; Methode nach Florini und Vestling

Durch Umkehrung der Gl. 7 erhält man die reziproke Form:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m^A + \frac{K_S^A K_m^B}{b}}{V} \cdot \frac{1}{a} + \frac{1 + \frac{K_m^B}{b}}{V}$$

Gl. 8

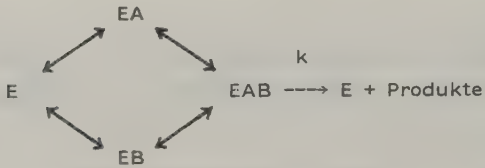
Bei der doppelt reziproken Auftragung von $1/v$ gegen $1/a$ bzw. $1/b$ bei einer Reihe verschiedener Konzentrationen von B bzw. A (Erster Schritt, sog. primary plot¹) entsteht eine Anzahl von Geraden, die sich über, unter oder in Höhe der $-1/a$ -Achse bzw. der $-1/b$ -Achse schneiden können. Im zweiten Schritt (secondary plot¹) werden die Steigungen (slope¹) bzw. die Ordinatenabschnitte (intercept¹) für alle a bzw. b gegen $1/b$ bzw. $1/a$ aufgetragen. Mit Hilfe algebraischer Ausdrücke lassen sich aus den so gewonnenen Achsenschnittpunkten alle Konstanten der Gleichungen 7 und 8 ermitteln.

¹ Terminologie nach Dixon und Webb

4.2.2 Einzelne Reaktionsmechanismen bei Systemen mit 2 Substraten

4.2.2.1 Zufallsmechanismus unter Gleichgewichtsbedingungen (Random order equilibrium pathway¹ nach Haldane)

Ein solches System kann wie folgt dargestellt werden:



Gl. 9

Der mit k bezeichnete Schritt ist geschwindigkeits-limitierend. Die vier hier wirksamen Gleichgewichtskonstanten hängen wie folgt untereinander zusammen:

$$K_S^A K_m^B = K_m^A K_S^B$$

Gl. 10

Es gilt Gleichung 7.

4.2.2.2 Zufallsmechanismus unter Fließgleichgewichtsbedingungen (Random order steady-state pathway¹)

Zur Beschreibung dieses Systems sind sehr komplexe kinetische Gleichungen nötig. Das System kann nicht durch Michaelis-Menten Konstanten ausgedrückt werden. Die doppelt reziproken Darstellungen zeigen nicht-lineare Charakteristik.

¹ Terminologie nach Dixon und Webb [15]

4.2.2.3 Geordnete Systeme (Compulsory-order systems¹), in denen ein ternärer Komplex gebildet wird.

Liegen steady-state Bedingungen vor, dann gilt Gleichung 7. Falls jedoch das erste Substrat in einer Gleichgewichtsreaktion gebunden wird, läßt sich das erste Substrat mit Hilfe der Primär- und Sekundärauftragungen identifizieren:

Bei doppelt reziproker Auftragung von $1/v$ gegen $1/a$ bei einer Reihe verschiedener b werden sich die entstehenden Geraden immer über der $1/a$ -Achse schneiden. Die Sekundärauftragung der Steigungen gegen $1/b$ ergibt eine Gerade durch den Ursprung. Bei einer Primärauftragung bei verschiedenen a liegt der Schnittpunkt der Geraden auf der $1/v$ -Achse.

Im Fall der UDP-Glucose Pyrophosphorylase wird das erste Substrat (Nucleotid) also offenbar nicht in einer Gleichgewichtsreaktion gebunden (siehe 4.2.4), sondern es lagen im Experiment steady-state Bedingungen vor.

4.2.2.4 Geordnete Systeme mit zu vernachlässigenden steady-state Konzentrationen von ternären Komplexen

Auch auf diesen als Theorell-Chance Mechanismus bekannten Reaktionsablauf ist Gleichung 7 anwendbar.

4.2.2.5 Geordnete Systeme, in denen kein ternärer Komplex gebildet wird.

In solchen Fällen läuft die Reaktion über eine Kette von binären Komplexen und eine Zwischenform des Enzyms, in der nur die übertragene Gruppe gebunden ist. (Abb. 6).

Wenn Anfangsgeschwindigkeiten gemessen werden, d. h. die Konzentration der Produkte gleich Null ist, ist der Schritt irreversibel, bei dem das erste Produkt entlassen wird, und es gilt demzufolge:

$$K_s^A = 0.$$

¹ Terminologie nach Dixon und Webb [15]

Doppelt reziproke Auftragungen bei einer Serie von Konzentrationen des anderen Substrates ergeben für beide Substrate Scharen von parallelen Geraden.

Einige Bezeichnungen für solche Systeme sind "Zwei-Schritt Transfer", "Doppelaustausch" oder "Ping-Pong Mechanismus".

4.2.3 Zur Unterscheidung zwischen verschiedenen kinetischen Reaktionsmechanismen-----

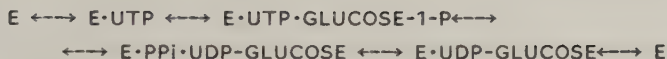
können eine ganze Reihe von Methoden herangezogen werden, die aber hier nur erwähnt werden sollen:

- Benutzung von Primärdiagrammen mit und ohne kompetitive Inhibitoren oder bei fixierten Relationen der Substrate zueinander.
- Produkt-Hemmungs-Studien
- "Dead-end"-Hemmung
- Alternative Substrate
- Haldane-Beziehungen
- Dalziel-Beziehungen
- Isotopenaustausch

4.2.4 Beispiel: UDP-Glucose-Pyrophosphorylase

Hier liegt ein geordnetes System mit ternären Komplexen vor.

Tsuboi und Mitarbeiter [98] haben mit Hilfe von "primary und secondary plots" sowie durch Produkt-Hemmstudien einen Mechanismus nachgewiesen, der nach Cleland als "ordered Bi-Bi-mechanism" bezeichnet wird. Der Reaktionsablauf läßt sich folgendermaßen darstellen:



Gl. 11

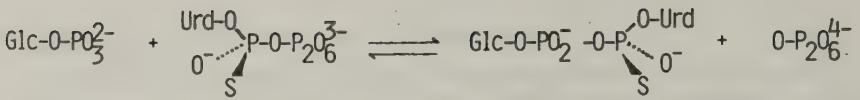
Das Nucleotid wird dabei als erstes Substrat gebunden und auch als letztes Produkt entlassen. Diese Reihenfolge ist für beide Richtungen der umkehrbaren Reaktion obligatorisch. Das System folgt der allgemeinen Gleichung 7.

Tsuboi et al. [98] erhielten lineare primary plots mit einem Schnittpunkt unterhalb der 1/UTP- bzw. 1/UDPG-Achse, wenn die Kurven für mehrere konstante Glucose-1-P bzw. PPi-Konzentrationen bei variablem UTP bzw. UDPG gemessen wurden. Kompetitive Hemmung wurde nur im Falle der Nukleotid-Paare beobachtet, während alle anderen Substrat-Produkt-Kombinationen nicht-kompetitive Hemmmuster zeigten. (Siehe auch 4.2.2.3)

Kwan-Fu Rex Sheu u. a. haben mit Hilfe von Isotopenaustauschstudien [81, 82] gezeigt, daß die sterische Konfiguration des nukleotidhaltigen Substrates während der Transferasereaktion umgekehrt wird, was die Existenz von ternären Komplexen zur zwingenden Voraussetzung hat ("single displacement"). Außerdem sind die beiden Akzeptoren der übertragenen Gruppe sterisch so verschieden, daß kein einzelner gemeinsamer Bindungsort am Enzym für beide Akzeptoren angenommen werden kann. Vielmehr erfolgt ein direkter Gruppenübergang von einem Akzeptor auf den anderen, wobei beide gleichzeitig an das Enzym gebunden bleiben.

Das Umklappen der Konfiguration wurde erst durch Einführung eines chiralen Phosphatrestes P α nachweisbar. Zu diesem Zweck wurde ein Sauerstoffatom durch Schwefel ersetzt. (Siehe dazu Abb. 7)

Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus darf für UDP-Galactose Pyrophosphorylase als wahrscheinlich angenommen werden.



Hypothetische Zwischenstufe

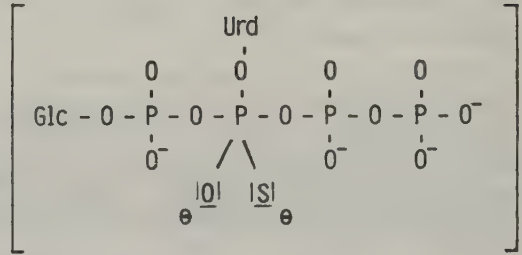


Abb. 7: Transferasemechanismus der UDPG-Pyrophosphorylase; ein Sauerstoffatom an P α ist durch Schwefel ersetzt.

4.3 Zwei verschiedene Enzyme katalysieren dieselbe Reaktion

Wenn zwei verschiedene Enzyme, z.B. Isoenzyme, das gleiche Substrat gemeinsam umsetzen, so gilt für die gesamte Reaktionsgeschwindigkeit v_t :

$$v_t = \frac{V_1 [S]}{K_1 + [S]} + \frac{V_2 [S]}{K_2 + [S]}$$

Gl. 12

K_1 und K_2 sind die Michaeliskonstanten des ersten und zweiten Enzyms, analog dazu V_1 und V_2 die Maximalgeschwindigkeiten. Für die Maximalgeschwindigkeit der Gesamtreaktion gilt:

$$V_t = V_1 + V_2$$

Gl. 13

Die Auftragung von $1/v_t$ gegen $1/[S]$ nach Lineweaver-Burk [58] folgt der Reziprokform der Gl. 11.

$$\frac{1}{v_t} = \frac{1 + \frac{K_1 + K_2}{[S]} + \frac{K_1 K_2}{[S]^2}}{V_1 + V_2 \frac{V_1 K_2 + V_2 K_1}{[S]}}$$

Gl. 14

In Abb. 8 ist eine theoretische Kurve nach Gl. 14 dargestellt.

Man sieht zwei hyperbolische Kurven, wobei die Kurve für negative $1/[S]$ -Werte im imaginären Bereich liegt. Die Tangenten durch die Abszissenschnittpunkte der Kurven sind identisch mit den Lineweaver-

Burk-Diagrammen, die sich aus den Geschwindigkeitsgleichungen der einzelnen Enzyme errechnen. Durch Addition der Aktivitätswerte beider Enzyme für alle $[S]$ und Auftragung in doppelt reziproker Form erhält man die dargestellten Kurven.

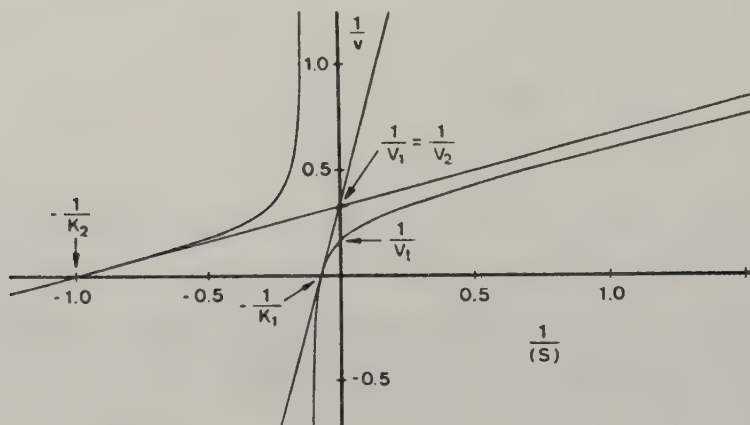


Abb. 8: Lineweaver-Burk-Diagramm einer Enzymreaktion, bei der zwei verschiedene Enzyme dasselbe Substrat katalysieren; theoretische Darstellung nach Gl. 14 mit $K_1 = 15$, $K_2 = 1$ und $V_1 = V_2 = 3$.

Das Krümmungsverhalten der Kurve wird nicht nur durch das Verhältnis der beiden Michaeliskonstanten beeinflusst, sondern auch durch die Relation von V_1 und V_2 , d.h. durch den Anteil der beiden Enzyme an der Gesamtreaktion.

Abbildung 9 zeigt die bei konstanten K_m -Werten für verschiedene V_1 und V_2 errechneten Kurven. Bei wachsendem V_2 nimmt zwar die Krümmung der Kurve zu, die Änderung der Steigung bei hohen $1/[S]$ -Werten wird jedoch sehr gering. Hier nähert sich die Kurve einer Geraden, deren Extrapolation die Abszisse in der Nähe von $-1/K_2$ schneidet (siehe Abb. 9, Kurve C). In diesem Bereich niedriger Substratkonzentrationen katalysiert also das Enzym mit der höheren Affinität zum Substrat den größten Teil der Gesamtreaktion.

Sonderfall: Wenn die beiden Michaeliskonstanten gleich groß sind, entsteht im Lineweaver-Burk-Diagramm eine Gerade.

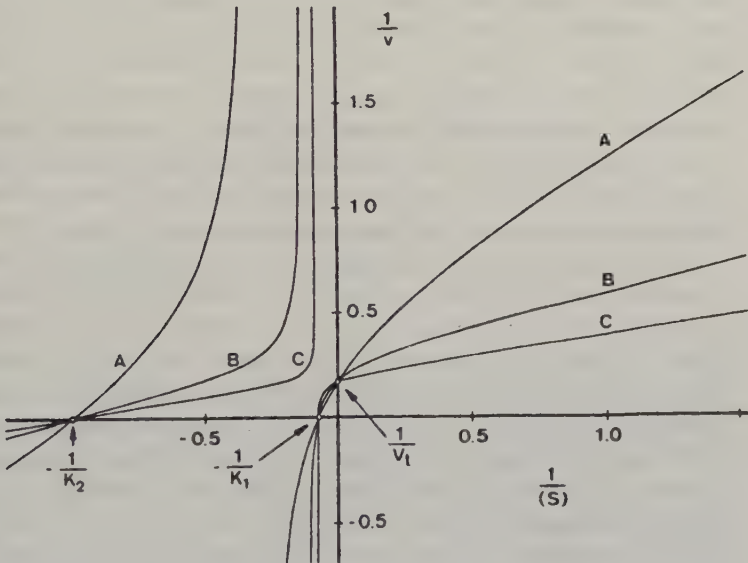


Abb 9: Lineweaver-Burk-Diagramm von Enzymreaktionen, bei denen zwei Enzyme dasselbe Substrat katalysieren; theoretische Darstellung.

	$K_1 = 15,$	$K_2 = 1;$
Kurve A:	$V_1 = 5,$	$V_2 = 1;$
Kurve B:	$V_1 = V_2 = 3$ (identisch mit Abb. 8);	
Kurve C:	$V_1 = 1,$	$V_2 = 5.$

4.3.1 Bestimmung der Enzymkonstanten aus Lineweaver-Burk-Diagrammen bei Systemen mit zwei Enzymen und einem Substrat [15]-----

Mit der hier dargestellten Methode können Näherungswerte für die einzelnen Konstanten erhalten werden.

- Bei einer Kurve, die bei hohen $1/[S]$ -Werten nahezu gerade und außerdem flach verläuft (Kurve C in Abb. 9), gilt die Bedingung: $K_1 > K_2$ und $V_2 > V_1$. Extrapoliert man den linearen Anteil der Kurve zur Abszisse, so bekommt man einen brauchbaren Näherungswert für K_2 , der umso genauer ist, je stärker die oben genannte Bedingung ausgeprägt ist. In der Praxis kann dies bedeuten, daß die Krümmung sogar übersehen wird. Gleichzeitig schneidet diese Extrapolationsgerade die Ordinate in $1/V_2$. Der Schnittpunkt der Kurve mit der $1/v$ -Achse $1/V_t$ läßt sich fast immer mit einiger Genauigkeit festlegen, so daß mit Gl. 13 V_1 errechnet werden kann. Damit sind drei Konstanten bekannt, und die vierte, K_1 kann man berechnen, indem man die bekannten Werte und ein Wertepaar eines beliebigen Punktes der Kurve in Gl. 14 einsetzt.
- Bei allen übrigen Kurven, bei denen die Krümmung im gesamten Verlauf der Kurve deutlich sichtbar ist, (Kurve A und B in Abb. 9) geht man folgendermaßen vor: Die Kurve wird bei niedrigen $1/[S]$ -Werten in einer Krümmung auf die $1/[S]$ -Achse extrapoliert, und man bekommt so V_t und K_1 . An diese Kurve wird im Abszissenschnittpunkt eine Tangente gelegt, welche die Ordinate in $1/V_1$ schneidet. Somit können mit Hilfe von Gl. 13 und 14 wieder die übrigen Werte ermittelt werden.

4.4 Mögliche Ursachen für nicht-lineare Lineweaver-Burk Darstellungen [15]

Die Ursachen, die für nicht-lineare doppelt reziproke Auftragungen von $1/v$ gegen $1/[S]$ verantwortlich sein können, sind mannigfaltig. Aus dem Kurvenverlauf kann meist nicht direkt auf die zugrundeliegende Ursache geschlossen werden, weil ganz unterschiedliche Phänomene sehr ähnliche Kurven hervorrufen können. Einige mögliche Ursachen sollen hier kurz angesprochen werden, wobei äußere Einflüsse, Kontamination der Enzym-Lösung mit Substrat oder nicht korrigierte Leerraten ausgeschlossen sein sollen.

4.4.1 Die Enzymreaktion zeigt vom Reaktionsmechanismus her keine Michaelis-Menten Charakteristik.-----

Dies ist beim "random-order steady-state pathway" von Enzymen mit zwei Substraten der Fall (vgl. 4.2.2.2), wobei die Reaktion alternativ über zwei oder mehr verschiedene enzymhaltige Komplexe laufen kann. Systeme mit zwei verschiedenen Arten von enzymhaltigen Komplexen lassen sich durch Gleichungen zweiten Grades (es taucht ein Ausdruck mit einer zweiten Potenz auf) und rechtsgekrümmte hyperbolische Kurven ausdrücken, solche mit noch mehr Verzweigungsmöglichkeiten besitzen Gleichungen entsprechend höheren Grades und erheblich komplexere Kurven. Als Beispiel sind in Abb. 10 mögliche Kurven dargestellt, die Gleichungen dritten Grades gehorchen.

4.4.2 Zwei verschiedene Enzyme

mit unterschiedlichen Michaelis-Konstanten katalysieren die gleiche Reaktion (siehe 4.3). Die resultierenden Kurven sind rechtsgekrümmt hyperbolisch.

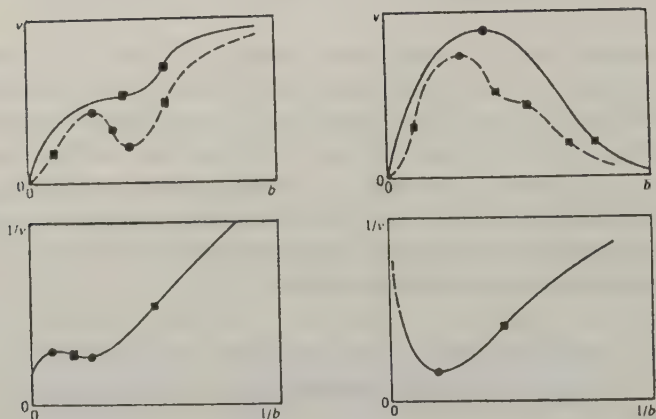


Abb. 10: Beispiele für mögliche Kurvenverläufe bei Systemen dritter Ordnung. Maxima und Minima sind durch ● gekennzeichnet, Umkehrpunkte durch ■.

4.4.3 Allosterische und kooperative Effekte

können doppelt reziproke Auftragungen in beiden Richtungen von der Geraden abweichen lassen. Solche Effekte können auftreten, wenn ein Substrat-, Aktivator- oder Inhibitormolekül (allgemein ein Ligand) durch seine Bindung einen positiven oder negativen Einfluß auf die Bindung nachfolgender Substratmoleküle hat. Beeinflußt ein Ligand die Bindung gleicher Moleküle, so spricht man von homotropem, ansonsten von heterotropem Effekt. Homotrope Effekte, in denen ein Ligand eine erhöhte Affinität des Enzyms zu nachfolgenden Molekülen des gleichen Liganden bewirkt, heißen positiv kooperativ, wenn die Affinität vermindert wird, werden sie als negativ kooperativ oder antikooperativ bezeichnet. In Abbildung 11 ist anhand von Substratbindungskurven je ein Beispiel für positive (a) und negative (b) Kooperativität dargestellt, daneben das normale kinetische Verhalten.

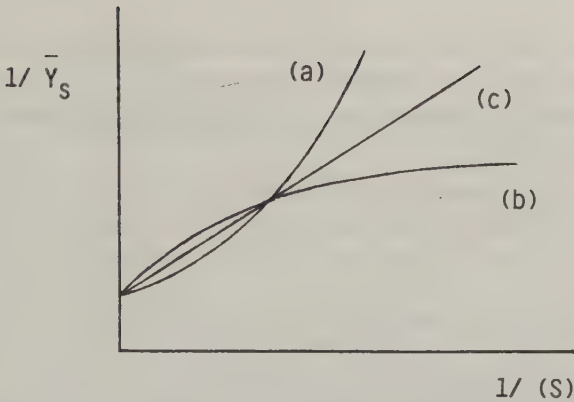


Abb. 11: Substratbindungskurven bei positivem (a), negativem (b) und ohne (c) kooperativen Effekt.

$\bar{Y}_s$ ist der Anteil des mit Substrat gesättigten Enzyms. K'_s ist für alle Kurven gleich. Der Hill-Koeffizient ist 2 für (a) und 0,5 für (b).

Systeme mit negativem kooperativem Effekt geben rechtsgekrümmte Hyperbeln im Lineweaver-Burk-Diagramm, solche mit positivem Effekt zeigen nach oben gekrümmte Kurven. Hierzu ein Beispiel: Substrataktivierung: Die steady-state-Gleichung eines "compulsory-order"-Systems lautet:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_{m'}^S}{s} + \frac{K_S^S K_{m'}^S}{s^2}}$$

Gl. 15

Die reziproke Form:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_{m'}^S \cdot 1}{[S] \cdot V} + \frac{K_S^S K_{m'}^S}{[S]^2} \frac{1}{V}$$

Gl. 16

K_S^S symbolisiert die scheinbare Dissoziationskonstante des Komplexes aus Enzym und Aktivator (= Substrat); K_m^S ist die Michaeliskonstante des aktivierbaren Enzyms. Abb. 12 zeigt eine theoretische Kurve.

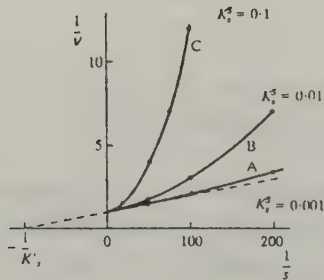


Abb. 12: Lineweaver-Burk-Diagramme bei Substrataktivierung. Für alle Kurven gilt: $K_m^S = 0,01$.

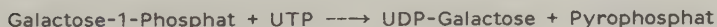
Wenn K_S^S sehr klein wird, nähert sich die doppelt reziproke Auftragung einer Geraden, aus der sich die Michaeliskonstante K_m^S bestimmen läßt (gestrichelte Linie in Abb. 12). Für $1/[S] = 0$ haben alle Kurven die gleiche Steigung, aber sie divergieren in sehr unterschiedlichem Ausmaß nach oben, je nach der Größe von K_S^S . Bei sehr hohen Werten für K_S^S kann die Kurve so stark gekrümmt sein, daß es unmöglich wird, eine Michaeliskonstante daraus zu bestimmen.

- 4.4.4 Es liegt eine enzymkatalysierte Reaktion zwischen zwei identischen Substratmolekülen vor. Die Gleichung und die daraus resultierende Kurve ähneln denen für Substrataktivierung.

5. ERGEBNISSE

5.1 Kinetische Studien; Verhalten der Richtung 1

Die Kinetik des Enzyms UDP-Galactose Pyrophosphorylase wurde bezüglich der Richtung 1 der enzymkatalysierten Reaktion untersucht. Diese Reaktion läßt sich durch folgende Gleichung beschreiben:



Alle hier aufgeführten Ergebnisse beziehen sich auf die Richtung 1 mit Ausnahme der Untersuchung bezüglich des Verhältnisses von Hin- zu Rückreaktion, bei der selbstverständlich auch die Richtung 2 gemessen wurde.

Im Verlauf der Untersuchungen mußten erst einige grundsätzliche Fragen abgeklärt werden, bevor detaillierte kinetische Analysen einschließlich der Bestimmung von Michaeliskonstanten vorgenommen werden konnten. Diese Fragen zum Zeitverlauf der Reaktion, zum pH-Optimum, zur Aktivierbarkeit durch Reduktionsmittel und zur Stabilität des Enzyms sollen zuerst dargestellt werden, dann folgen die Anreicherungsversuche und zuletzt die kinetischen Daten.

5.1.1 Zeitverlauf der Reaktion 1

Im Abschnitt 3.1.2 ("Methodik") wurde bereits angesprochen, daß die Isotopenmethode einen über die Zeit linearen Reaktionsverlauf voraussetzt. Menschliche Gewebe enthalten aber nur sehr geringe Aktivitäten der UDP-Galactose Pyrophosphorylase, Richtung 1, weshalb lange Inkubationszeiten erforderlich werden, um ausreichende Umsatzraten zu erhalten.

Um nachzuweisen, daß diese Voraussetzung erfüllt ist, wurde eine Zeitkurve der Reaktion gemessen. Abb 13 A zeigt den Reaktionsverlauf in einem Leberhomogenat. Die Ansätze wurden wie unter 3.1.2 ("Methoden") beschrieben ausgeführt und enthielten je 0,46 mg Protein/ml.

Zum Zeitpunkt 0 und in der Folge alle 20 min wurden je zwei normale Tests und zwei Leerwerte ohne UTP gestoppt und analysiert. Die Leerwerte hatten zu jedem Zeitpunkt die gleiche Höhe und wurden von der Aktivität abgezogen. In der Abbildung ist die Enzymaktivität in counts per minute (CPM) ausgedrückt. Bei jedem Test wurden 137300 cpm = 100 % eingesetzt.

Aus Abbildung 13 A ist ersichtlich, daß der Reaktionsverlauf über 4 Stunden völlig linear bleibt. Die Voraussetzung ist also erfüllt. In der Praxis wurden für Routineanalysen Inkubationszeiten von zwei Stunden gewählt.

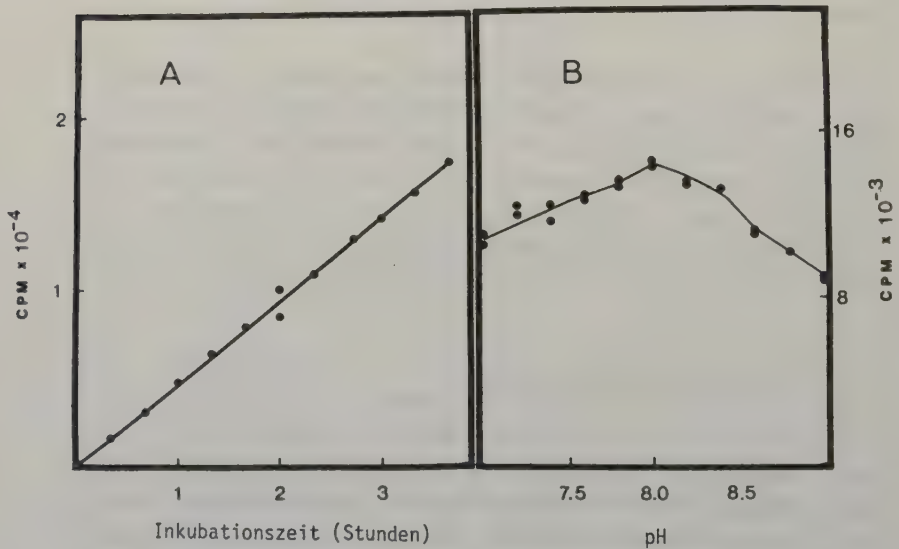


Abb. 13 A: Die UDP-Galactose Pyrophosphorylase-Aktivität der Reaktion 1 in Erwachsenenleber (15 J. w.) in Beziehung zur Inkubationszeit.

B: Die pH-Abhängigkeit der Reaktion der UDP-Galactose Pyrophosphorylase. Gleiche Probe wie in Abb. 13 A.

In Abb. 14 ist der Reaktionsverlauf für Erythrozytenenzym dargestellt. Die Kurve mit den ausgefüllten Kreisen beschreibt den Reaktionsverlauf bei Verwendung des normalen Ansatzes. Jeder Testansatz enthielt in der Endverdünnung 1,9 g Hb/100 ml. Die Reaktion blieb bis über 2 Stunden linear. Nachdem ca. 5 % des Substrates umgesetzt sind, beginnt die Steigung der Kurve abzunehmen, wahrscheinlich weil die Rückreaktion an Bedeutung gewinnt.

In den Routinemessungen betrug die Inkubationszeit immer 2 h.

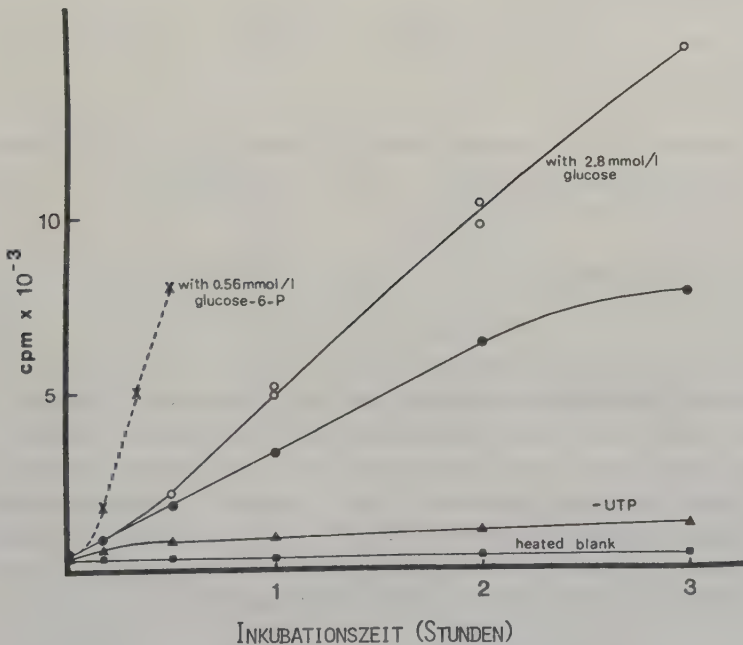


Abb. 14: Zeitverlauf der UDP-Galactose Pyrophosphorylase-Reaktion, Richtung 1 bei adulten Erythrozyten (23 J. m.). Ohne Zusätze: —●—; mit 2,8 mmol/l Glucose im Ansatz —○—; mit 0,56 mmol/l Glucose-6-Phosphat im Ansatz --X--. ▲, ■: Leerwerte, ohne UTP und geheizt.

5.1.2 pH-Kurve

Um optimale Bedingungen für die Meßreaktion zu schaffen, muß der pH-Wert des Reaktionsmediums in dem für das Enzym günstigsten Bereich liegen. Um diesen Bereich zu ermitteln, wurde eine pH-Kurve für das Leberenzym gemessen, die in Abb 13 B zu sehen ist. Die Testansätze enthielten jeweils 0,55 mg Protein/ml. Bei der Messung dieser Kurve kamen Tris-Chlorid-Puffer mit einer Endkonzentration von 66 mmol/l zur Verwendung. Der getestete pH-Bereich lag zwischen pH 6,9 und 8,9 und wurde in Schritten von 0,2 pH-Einheiten im Reaktionsgemisch ausgemessen.

Abb. 13 B zeigt eine flach verlaufende pH-Kurve mit einem Optimum bei pH 8,0.

Der pH-Wert des Testansatzes betrug gleichzeitig 7,9, deshalb wurde der End-pH bei allen Messungen auf diesen Wert eingestellt.

5.1.3 DTT-Effekt

Für UDP-Galactose Pyrophosphorylase in menschlicher Leber ist eine zweifache Aktivitätserhöhung durch das Sulfhydrylreagenz Dithioerythritol beschrieben worden [1]. Dieses Experiment wurde mit mehreren menschlichen Organen und Dithiothreitol als Aktivator nachvollzogen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgelistet. Für adulte Leber konnte eine Aktivierung von nur 21 % festgestellt werden, in anderen Geweben war der Effekt jedoch stärker ausgeprägt. Beim Nierengewebe war sogar eine enorme Umsatzsteigerung zu beobachten.

Danach enthielten alle Testansätze 3,33 mmol DTT pro l.

Tab. 5: Die Wirkung von Dithiothreitol¹ auf UDP-Galactose Pyrophosphorylase-Aktivitäten (in nmol/min·mg Protein; bei Blut: $\mu\text{mol/h}\cdot\text{g Hb}$).

Gewebe		Aktivität		% Erhöhung der Aktivität
		ohne DTT	mit DTT ¹	
Leber, adult	1	1,19	1,44	+ 21
	2	1,15	1,37	+ 19
	3	1,16	1,43	+ 23
	fetal	0,075	0,20	+ 167
Hirn, adult	1	0,18	0,13	- 28
	2	0,14	0,13	- 7
Muskel, adult	1	0,14	0,18	+ 29
	2	0,66	0,70	+ 6
Niere, adult	1	0,0025	0,068	+ 2620
	2	0,0027	0,050	+ 1752
Erythrozyten, adult	1	0,52	0,84	+ 62
	2	0,68	0,80	+ 18

¹ 3,33 mmol/l

5.1.4 Stabilität des Enzyms

Dialysierte Homogenate von adulter und fetaler Leber, von adultem Muskel, Niere und Gehirn sowie dialysierte Hämolysate adulter Erythrozyten wurden bei +1°C (Eiswasser), +37°C und +56°C vorinkubiert, die spezifischen Aktivitäten danach in der üblichen Weise gemessen und mit vorher bestimmten Werten verglichen.

Es zeigte sich, daß die Aktivitäten aller untersuchten Organe bei +1°C über mindestens 2 h unverändert bleiben, während das Enzym überall schon nach 10 min bei +56°C nahezu vollständig inaktiviert wird (1-3 % Restaktivität). Vorinkubation bei +37°C für 1 h bewirkte in adulter und fetaler Leber und in adultem Muskel einen Aktivitätsverlust von 5-6 %, dagegen konnte bei adultem Hirn- und Nierenenzym keine Abnahme der Aktivität festgestellt werden.

In tiefgefrorenem Zustand scheint adultes Leberenzym über lange Zeit sehr stabil zu sein. Wiederholte Messungen der gleichen, bei -22°C gelagerten Gewebe haben in einem Zeitraum von 6 Monaten keinen Abfall der spezifischen Aktivität erkennen lassen. Im Gegensatz dazu wurde das in eingefrorenem Nierengewebe Erwachsener enthaltene Enzym rasch inaktiviert. Innerhalb von 6 Monaten erfolgte ein Abfall der Enzymaktivität auf 14 % des Ausgangswertes.

5.1.5 Anreicherungsversuche

Die verschiedenen zur Anreicherung des Enzyms verwendeten Methoden sind bereits im Abschnitt "Methoden" ausführlich dargestellt worden. Es folgt nun eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Alle Versuche wurden mit sehr geringen Mengen an Homogenat ausgeführt.

5.1.5.1 Ammoniumsulfatfraktionierung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in menschlichen Geweben

Fällungen wurden in adulter und fetaler Leber sowie mit adultem Hirngewebe durchgeführt. Im Falle der adulten Leber erfolgte auch eine vergleichende Messung der Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase. Bestimmungen der UDP-Glucose Pyrophosphorylase wiesen auf eine der UDP-Galactose Pyrophosphorylase entsprechende Aktivitätsverteilung hin und sind hier nicht dargestellt. Die übrigen Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Ammoniumsulfatfraktionierung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in Geweben.

Sättigung in %	Adulte Leber		Fetale Leber		Adultes Gehirn	
	UDP-Gal Pyrophos- phorylase	Uridyl- Trans- ferase	UDP-Gal Pyrophos- phorylase		UDP-Gal Pyrophos- phorylase	
Homogenat	0,93 (100) ¹	16 (100)	0,31 (100)		0,098 (100)	
0 - 20	0,70 (0,9)	6,6 (0,3)	0,05 (2,6)		0,034 (1,6)	
20 - 30	0,49 (4,0)	17,2 (3,4)	0,08 (2,3)		0,017 (2,3)	
30 - 40	2,12 (35,3)	30,2 (28,3)	0,29 (15,3)		0,099 (7,0)	
40 - 50	1,02 (23,0)	3,5 (4,0)	0,95 (26,4)		0,193 (38,5)	
50 - 60	0,05 (0,7)	0	0,07 (1,3)		0,039 (3,6)	
Überstand	0	0	0,03 (2,2)		0,003 (1,1)	

¹ Spezifische Aktivität (nmol/l.mg Protein); die eingeklammerten Zahlen geben den Anteil der Gesamtaktivität in % an.

Die unterschiedliche Verteilung der spezifischen Aktivitäten in den einzelnen Organen beruht zum Teil auf der verschiedenen Verteilung der Gesamtproteine in den einzelnen Geweben.

Wenn mit möglichst wenigen Schritten eine maximale Anreicherung bei befriedigender Ausbeute erreicht werden soll, so empfiehlt sich die Auswahl des Sättigungsbereiches zwischen 35 und 45 %. Die Gesamtausbeute erhöht sich dabei auf 84 % (adulte Leber) bzw. 73 % (fetale Leber).

Im Falle der adulten Leber wurden mehr als 50 % der Enzymaktivität zwischen 30 und 40 % Ammoniumsulfatsättigung präzipitiert, während bei adultem Hirngewebe und fetaler Leber die Fraktion 40 - 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mehr Aktivität enthielt. Die Uridyltransferase wurde zu mehr als 70 % in den Fraktionen zwischen 30 und 40 % Sättigung gefunden, wobei die Ausbeute bei diesem Enzym geringer war.

5.1.5.2 Extraktion von Hämolyisaten durch Calcium Phosphat

In Tabelle 7 sind die Resultate eines Anreicherungsversuches mit Calcium-Phosphat-Gel aufgelistet. Außer der UDP-Galactose Pyrophosphorylase wurden die Aktivitäten der UDP-Glucose Pyrophosphorylase (Richtung 1) und Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase gemessen.

Tab. 7: Calciumphosphatfraktionierung von Erythrozytenenzymen

Probe	UDP-Glu Pyrophos- phorylase (A)	UDP-Gal Pyrophos- phorylase (B)	Uridyl- Trans- ferase	A/B
Hämolyisat	2,38 (100) ¹	0,010 (100)	0,52 (100)	238
Überstand	0,37 (9,2)	0,002 (10,3)	0,62 (70,6)	185
Gel-Eluat 1. Fraktion	34,8 (3,7)	0,048 (1,5)	0,06 (0,16)	725
Gel-Eluat 2. Fraktion	41,1 (16,5)	0,316 (29,9)	1,08 (2,0)	130

¹ Spezifische Aktivität (nmol/min.mg Protein); die eingeklammerten Zahlen sind % der Gesamtaktivität.

Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse erfolgt im Abschnitt 6.1 "Methodendiskussion".

Durch Kombination der Calcium-Phosphat-Extraktion mit einer anschließenden Ammoniumsulfatfraktionierung ließ sich die spezifische Aktivität der UDP-Galactose Pyrophosphorylase insgesamt auf das 100-fache des Ausgangswertes erhöhen.

5.1.6 Spezifische Aktivitäten der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in Geweben -----

Eine Aufstellung der Aktivitäten der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in verschiedenen Organen von Erwachsenen und Feten ist in Tabelle 8 zu sehen. Die Normalwerte der Richtung 1 wurden bei 1,33 mM UTP und 1,0 mM Gal-1-P gemessen.

Leber vom Erwachsenen enthielt unter diesen Bedingungen die höchste Aktivität, gefolgt von Skelettmuskulatur (M. psoas). Es muß hier besonders festgestellt werden, daß Leber das einzige Organ war, in dem die Aktivität des adulten Gewebes diejenige fetaler Organe deutlich übertraf. Bei den übrigen Organen (Muskel-, Hirn- und Nierengewebe) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivitäten adulter und fetaler Gewebe gefunden werden. Fetale Nieren- und Muskelhomogenate schienen sogar geringfügig höhere Aktivitäten im Vergleich mit den entsprechenden Geweben Erwachsener zu enthalten.

In der Leberbiopsie eines 4 Monate alten Knaben mit Galactosämie (Uridyltransferaseaktivität = 0) wurde eine normale Aktivität für UDP-Galactose Pyrophosphorylase gemessen (1,04 nmol/min·mg Protein).

Tab. 8: Spezifische Aktivitäten der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in menschlichen Geweben.

Gewebe	N	Aktivität (nmol/min.mg Protein)		Keq ¹
		$\bar{X} \pm$ S.D.	Bereich	
Leber				
adult	12	1,09 $\pm$ 0,30	0,73 - 1,45	42
fetal	3	0,20; 0,47; 0,24		32
Gehirn				
adult	7	0,17 $\pm$ 0,05	0,10 - 0,23	22
fetal	2	0,07; 0,13		20
S. Muskel				
adult	6	0,45 $\pm$ 0,28	0,18 - 0,85	20
fetal	3	0,23; 0,56; 0,82;		36
Niere				
adult	7	0,11 $\pm$ 0,08	0,05 - 0,24	14
fetal	3	0,13; 0,13; 0,15;		23

¹ (UDP-Gal) (PPi)

(Gal-1-P) (UTP); z. Vgl.: K_{eq} bei adulten Erythrozyten = 42

5.1.7 Aktivität der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in Erythrozyten von Normalpersonen und Galactosämiekranken in Abhängigkeit vom Alter.-----

Die Enzymaktivität wurde in dialysierten Erythrozytenhämolysaten von Galactosämiekranken und gesunden Kontrollpersonen verschiedener Altersstufen gemessen, ebenso in Nabelschnurblut (dialysierte Erythrozytenhämolysate) und in fetalem Blut. Es mußte fetales Vollblut verwendet werden, weil leider keine fetalen Erythrozyten verfügbar waren. Allerdings haben Experimente mit Blut von Erwachsenen gezeigt, daß das in dialysiertem Vollblut enthaltene Enzym die gleichen Eigenschaften wie Erythrozytenenzym besitzt, sowohl im Hinblick auf die spezifische Aktivität, als auch in Bezug auf die Enzymkinetik. Blutplasma enthält keine Enzymaktivität. Die errechneten spezifischen Aktivitäten, bezogen auf Hämoglobin, wurden gegen das Lebensalter graphisch aufgetragen und sind aus Abb. 15 ablesbar.

Die Enzymaktivität betrug bei Erwachsenen (14 - 38 J.) $0,76 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g Hb}$ ($n = 7$).

Fetales Blut enthält 5 - 10mal höhere Aktivitäten als Blut normaler Erwachsener. Ein mit $1,08 \pm 0,23$ $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g Hb}$ ($n = 9$) im Vergleich zum gesunden Erwachsenen etwas höherer Wert wurde auch bei Neugeborenen (1 - 28 Tage) bestimmt.

Bei Normalpersonen nimmt die spezifische Aktivität mit steigendem Alter bis zum Adoleszentenalter kontinuierlich ab. Während der Fetalperiode scheint bis zum Geburtstermin sogar ein drastischer Aktivitätsabfall stattzufinden, der durch weitere Messungen an fetalem Blut noch genauer abzuklären wäre. Bei Galactosämiekrankheit lagen die spezifischen Aktivitäten durchweg etwas unter denen vergleichbarer Normalpersonen ($0,52 \pm 0,11$ $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g Hb}$; $n = 11$). Insbesondere scheint hier auch der postnatale Abfall zu fehlen. Die Enzymaktivität in fetalem Galactosämieblut konnte mangels einer solchen Blutprobe nicht bestimmt werden.

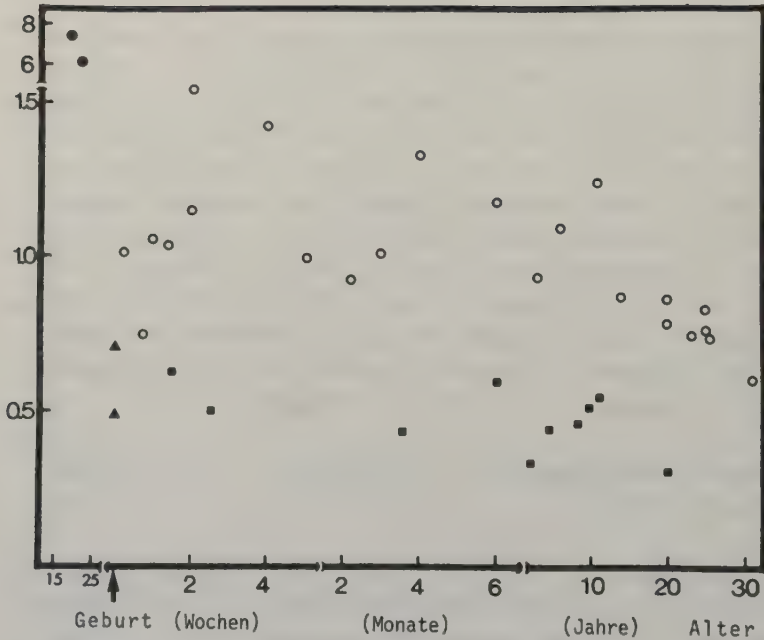


Abb. 15: Die UDP-Galactose Pyrophosphorylase-Aktivität der Reaktion 1 in Erythrozyten verschiedener Altersstufen. Fetales Blut: ●, (Gestationsalter in Wochen), Nabelschnurblut: ▲, Galactosämiëblut: ■, normale Erythrozyten: ○. Die Enzymaktivität ist angegeben in $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g Hb}$.

Leukozyten: Die Aktivität der UDP-Galactose Pyrophosphorylase wurde an zwei Leukozytenpräparaten von normalen Erwachsenen bestimmt. Sie betrug 0,34, bzw. 0,40 nmol/min·mg Protein.

5.1.8 Verhältnis der Aktivitäten von Hin- und Rückreaktion bei UDP-Galactose Pyrophosphorylase-----

Die Gleichgewichtskonstante K_{eq} gibt das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von Rückreaktion (Richtung 2) und Hinreaktion (Richtung 1) wieder. Es gilt folgende Beziehung:

$$K_{eq} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{v_2}{v_1} \cdot \frac{[\text{UDP-Gal}][\text{PPi}]}{[\text{Gal-1-P}][\text{UTP}]} ; \quad \text{Gl. 17}$$

Im Gleichgewicht ist $v_2 = v_1$ und K_{eq} ist gleich dem Verhältnis von Produkten zu Substraten. Umgekehrt gibt das Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten v_2/v_1 den Wert von K_{eq} an, wenn der Quotient aus den Konzentrationen von Produkten und Substraten gleich 1 ist.

In dieser Untersuchung betrugen die Konzentrationen von UDP-Galactose und Galactose-1-Phosphat 1mmol/l, die von PPi und UTP 1,3 mmol/l. Daher gilt: $K_{eq} = v_2/v_1$.

K_{eq} erscheint in der letzten Spalte der Tabelle 8. Die Geschwindigkeit der Reaktion 2 war in allen Geweben wesentlich höher als die Geschwindigkeit der Reaktion 1. In Leber und Erythrozyten von Erwachsenen betrug das Verhältnis über 40, in anderen adulten und fetalen Geweben war es etwas niedriger.

5.1.9 UDP-Glucose Pyrophosphorylase Aktivitäten

Zur besseren Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit vorgestellten Daten für UDP-Galactose Phosphorylase mit Werten aus der Literatur wurden auch einige Messungen der UDP-Glucose Phosphorylase vorgenommen und deren Ergebnisse in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Endkonzentrationen von Glucose 1-Phosphat und UTP waren jeweils 2 mmol/l. Die Gleichgewichtskonstante der UDP-Glucose Pyrophosphorylase für adulte Leber liegt bei 1,5, sie ist damit wesentlich kleiner als die entsprechende Konstante für UDP-Galactose Pyrophosphorylase.

Tab. 9: UDP-Glucose Pyrophosphorylase Aktivitäten

Organe: nmol/min · mg Protein

Blut: µmol/h · g Hb

Gewebe	n	$\bar{X} \pm S.D.$	Bereich	K_{eq}
Leber				
adult	5	582 ± 46	500-610	1,5
fetal	2	330, 220		
Erythrozyten				
adult	5	153 ± 15	140-175	

Das Verhältnis der Aktivitäten der UDP-Glucose Pyrophosphorylase zu denen der UDP-Galactose Pyrophosphorylase beträgt etwa 530 bei adulter Leber, aber nur 200 bei Erythrozyten.

5.1.10 Lineweaver-Burk-Diagramme

Es sollte hier vorausgeschickt werden, daß die Kurven für variables Galactose-1-Phosphat bei hoher Substratsättigung mit UTP gemessen wurden, die Kurven für variables UTP dagegen aus methodischen Gründen nur bei relativ unoptimalen Galactose-1-Phosphat-Konzentrationen bestimmt werden konnten. Wegen der sehr großen Michaelis-konstante für Galactose-1-Phosphat wären zur Schaffung (theoretisch) optimaler Bedingungen Konzentrationen in der Größenordnung von mehreren Mol/l notwendig. Dies ist einerseits aus Kostengründen nicht praktikierbar, andererseits würde die spezifische Radioaktivität des eingesetzten Substrates durch die Verdünnung mit nicht markiertem Galactose-1-Phosphat so stark abgesenkt, daß die Netto-Zählraten in nicht mehr meßbare Bereiche gelangen würden. Vgl. auch 4.2, Seite 45 und 6.1 (Methodendiskussion), Seite 92.

- Galactose-1-Phosphat variabel, UTP = konstant = 1,33 mM.

Adulte Leber zeigt als einziges Organ ein lineares doppelt reziprokes Diagramm (Abb. 16 A). Daraus läßt sich eine sehr hohe scheinbare Michaeliskonstante von ca. 40 mM Galactose-1-Phosphat ermitteln. Die Kurven aus Gehirn und Niere Erwachsener waren leicht bis mäßig nach rechts gekrümmt, während das Diagramm bei adultem Skelettmuskel eine sehr starke rechtskonvexe Krümmung zeigte (Abb. 16, B, C, D). Fetale Leber, Muskel und Niere verhielten sich ähnlich wie adulter Muskel; bei Leber und Niere begannen die Kurven im zweiten Teil sogar wieder abzufallen (Abb. 16, A, C, D). Die Diagramme von adultem und fetalem Gehirn stimmten in ihrer sanften Krümmung nach rechts weitgehend überein (Abb. 16 B).

Die Untersuchungen am Erythrozytenenzym ergaben ähnliche Ergebnisse wie die bei Organen (Abb. 16 E). Die Kurven waren bei allen untersuchten adulten Blutproben leicht rechtskonvex gekrümmt, sowohl bei Vollblut, als auch bei Erythrozyten. Die fetale Kurve dagegen beschrieb auch hier einen stark geknickten Verlauf. Interessanterweise waren die Diagramme für Galactosämie-Erythrozyten immer linear (K_m mind. 25 mM). Beinahe linear mit hohem K_m war die Kurve für Leukozyten.

- UTP variabel, Galactose-1-Phosphat = konstant = 1,0 mM

Auch hier bildete das Enzym aus adulter Leber und aus Galactosämie-Erythrozyten eine Ausnahme mit einem linearen Lineweaver-Burk-Diagramm und einem niedrigen K_m -Wert von 0,06 mM bzw. 0,14 mM UTP (Abb. 16, A, E). Auch das Diagramm für adultes Nierenenzym ist annähernd linear, weist aber einen höheren K_m -Wert auf (Abb. 16 D). Adultes Muskelenzym bewirkt eine deutliche Rechtskrümmung, während alle anderen Organe einschließlich Blut eine mehr oder weniger deutlich aufwärts gerichtete Biegung im Lineweaver-Burk-Diagramm aufweisen (Abb 16). Besonders stark aufwärts gebogene Kurven finden sich bei den fetalen Organen. Die Kurve für Leukozyten glich der für Muskelenzym von Erwachsenen (nicht gezeigt).

- ZUSAMMENFASSEND kann festgestellt werden:

Nur die Enzyme aus adulter Leber und aus Erythrozyten Galactosämiekranker liefern lineare Lineweaver-Burk-Diagramme für beide Substrate. Die Affinität zu Galactose-1-Phosphat ist in beiden Fällen sehr niedrig, die zu UTP dagegen wesentlich höher. Bei den übrigen Geweben konnten wegen gebogener Kurven keine Michaeliskonstanten ermittelt werden. Die Krümmung der Diagramme für Galactose-1-Phosphat war rechtskonvex, die Kurven für UTP beschrieben mit Ausnahme des adulten Muskelenzyms (und des Leukozytenenzyms) eine nach oben offene Parabel. Die fetalen Enzyme bewirkten wesentlich stärker gekrümmte Kurven für beide Substrate.

LEBER

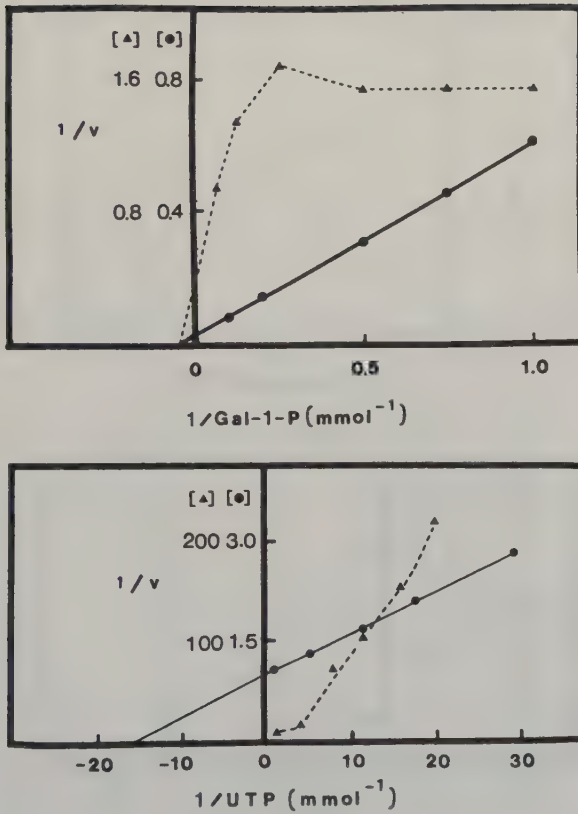


Abb. 16 A: Die Lineweaver-Burk-Diagramme für Galactose-1-Phosphat und UTP in menschlicher Leber.
 Erwachsene (15 J. w., gleiche Probe wie in Abb. 1): ---●---, Fetus (18-19 SSW, m.): ---▲---.
 Für K_m Gal-1-P: UTP = 1,3 mM;
 für K_m UTP : Gal-1-P = 1 mM.

GEHIRN

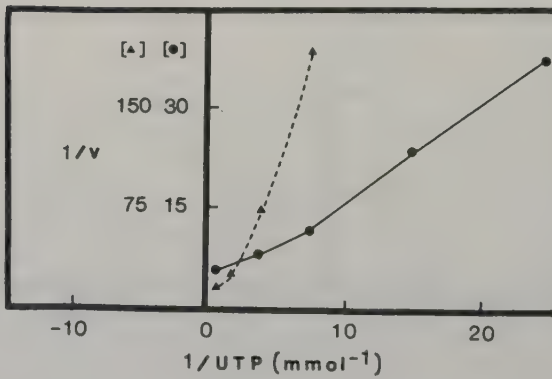
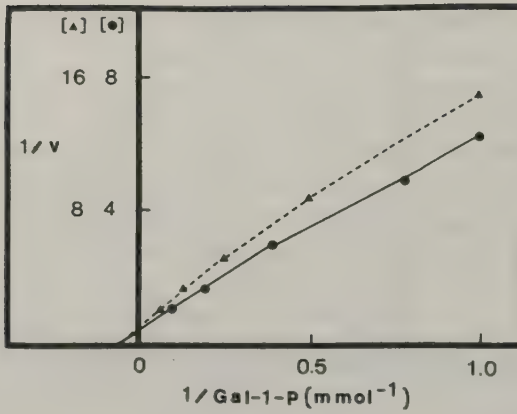


Abb. 16 B: Die Lineweaver-Burk-Diagramme in menschlichem Hirngewebe.

Erwachsene (15 J., w.): ---●---, Fetus (16 SSW, w.): ---▲---

Für K_m Gal-1-P: UTP = 1,3 mM;

für K_m UTP : Gal-1-P = 1 mM.

MUSKEL

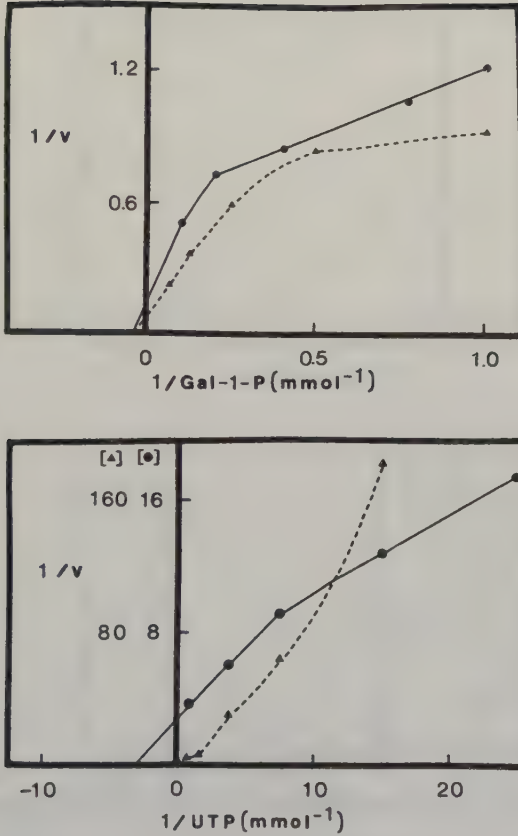


Abb. 16 C: Die Lineweaver-Burk-Diagramme in Skelettmuskel (M. psoas).

Erwachsene (62 J., w.): ---●---, Fetus (18-19 SSW, m.): ---▲---.

Für K_m Gal-1-P: UTP = 1,3 mM;

für K_m UTP : Gal-1-P = 1 mM.

NIERE

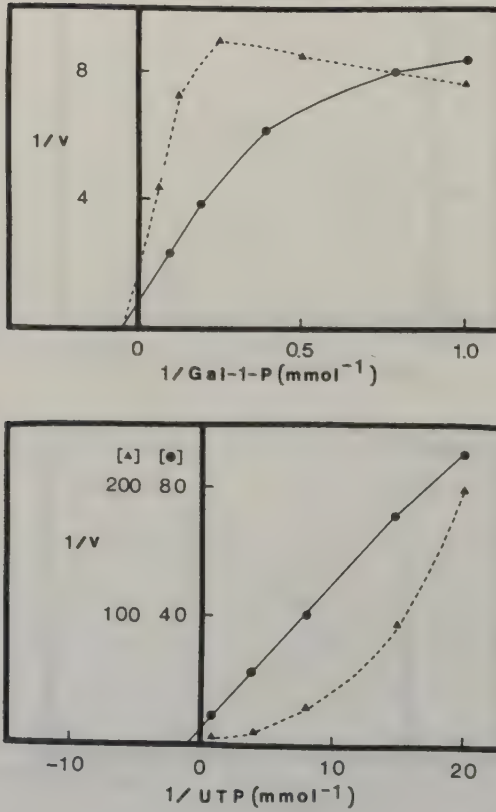


Abb. 16 D: Die Lineweaver-Burk-Diagramme in menschlicher Niere.
Erwachsene (40 J., m.): ---●---, Fetus (16 SSW, w.):
---▲---.

Für K_m Gal-1-P: UTP = 1,3 mM;
für K_m UTP : Gal-1-P = 1 mM.

BLUT

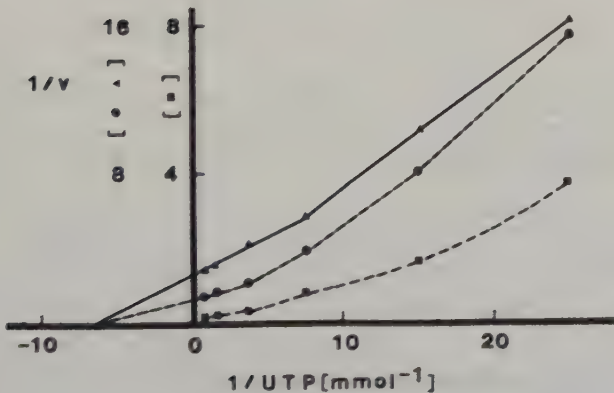
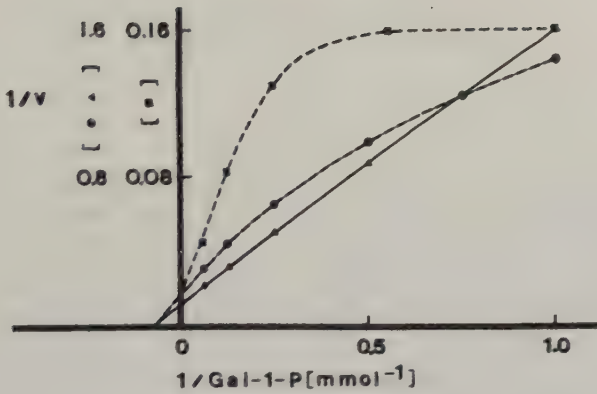


Abb. 16 E: Die Lineweaver-Burk Diagramme von menschlichem Blut.
 Normale adulte Erythrozyten (24 J., m): ---●---, Feten
 (22 SSW, w.): --■-- --, Galactosämie (4 J., m.):
 ---▲---.
 Für K_m Gal-1-P: UTP = 1,3 mM;
 für K_m UTP : Gal-1-P = 1 mM.

- Versuch einer Berechnung der Enzymkonstanten bei adultem Erythrozytenenzym für Galactose-1-Phosphat als variablem Substrat bei konstantem $[UTP] = 1,3 \text{ mM}$.

Strenggenommen ist das in 4.3.1 beschriebene Verfahren nur beim Vorliegen eines Systems aus zwei Enzymen und nur einem Substrat zulässig. Unter der Voraussetzung, daß ein "compulsory-order" System mit zwei Substraten und einem ternären Komplex vorliegt, und die Konzentration des ersten Substrates sehr hoch und konstant ist, kann dieses Verfahren auch zur Abschätzung der Konstanten für das zweite Substrat angewendet werden. Es muß hier nochmals betont werden, daß in diesem Fall als gegeben unterstellt wird, daß die Krümmung des L-B-Diagramms bei adultem Erythrozytenenzym allein auf der Anwesenheit zweier Isoenzyme beruht und andere Effekte keine Rolle spielen.

Unter Anwendung der graphischen Methode können folgende Näherungswerte erhalten werden:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 38 \text{ mM}, & K_2 = 0,6 \text{ mM} \\ V_1 = 12, & V_2 = 1 \quad (\mu\text{mol/h}\cdot\text{gHb}) \end{array}$$

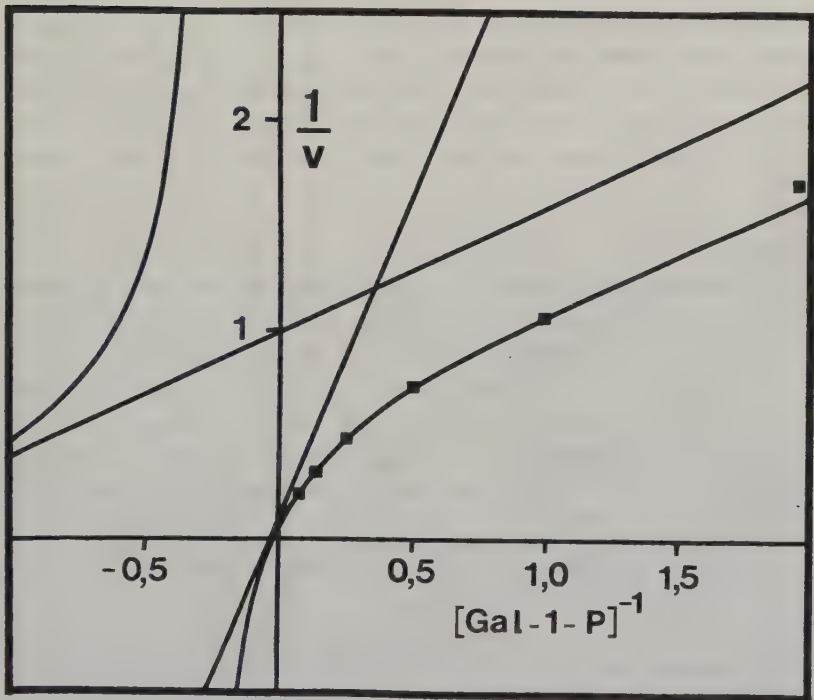
Die experimentell bestimmten Werte passen sehr gut in die daraus errechnete Kurve, wie Abb. 17 zeigt. Man kann also annehmen, daß die Näherungswerte ungefähr die tatsächlichen Verhältnisse wiedergeben.

Abb. 17: Lineweaver-Burk-Diagramm für adulte Erythrozyten und theoretische Näherungskurve mit

$K_1 = 38 \text{ mM}$, $K_2 = 0,6 \text{ mM}$ Galactose-1-Phosphat.

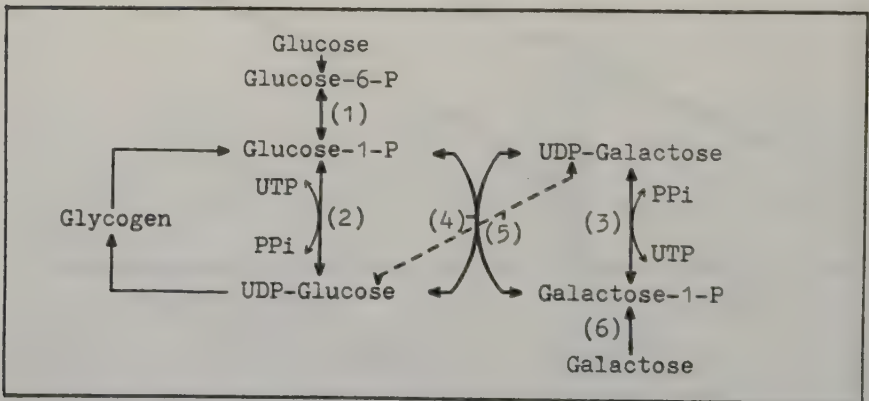
$V_1 = 12$, $V_2 = 1 \text{ } \mu\text{mol/h} \cdot \text{gHb}$.

--■--: experimentell bestimmte Werte



5.1.11 "Glucose-Effekt"

Die bei der Bestimmung der UDP-Galactose Pyrophosphorylase, Richtung 1, gemessenen Umsatzraten in nicht dialysiertem Vollblut fallen stets höher aus als in gewaschenen Erythrozyten. Blutplasma enthält jedoch selbst keine Enzymaktivität. Bei der Suche nach dem verantwortlichen Plasmabestandteil fand sich, daß Glucose die Umsatzrate in Erythrozyten-Hämolysaten erheblich steigert (bis zu 300 %) [85]. Dieser Sachverhalt ist auch in Abb. 14, "Zeitverlauf in Erythrozyten", veranschaulicht. Glucose-6-Phosphat zeigt einen noch wesentlich stärkeren Effekt als Glucose. Dieses Phänomen beruht höchstwahrscheinlich auf einem Artefakt, das folgendermaßen zustandekommt (vgl. Schema 18; "Beziehungen zwischen Glucose und Galactose":



- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| (1) Phosphoglucomutase | (2) UDP-Glu pyrophosphorylase |
| (3) UDP-Gal pyrophosphorylase | (4) Uridyltransferase |
| (5) Epimerase | (6) Galactokinase |

Abb 18: Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen Glucose- und Galactosestoffwechsel.

Glucose wird über Glucose-6-Phosphat und Glucose-1-Phosphat in UDP-Glucose umgewandelt. UTP dient hierbei als notwendiges Substrat (Leerwerte ohne UTP waren in Anwesenheit von Glucose niedriger als üblich). Die Uridyltransferase wandelt das angebotene markierte Galactose-1-Phosphat mit Hilfe der entstandenen UDP-Glucose in markierte UDP-Galactose und in Glucose-1-Phosphat um, womit ein Kreislauf entstehen kann. Auf diese Weise werden mit der Isotopenmethode in Anwesenheit von Glucose zu hohe Aktivitäten bestimmt.

Wie erwartet ist dieser Effekt in Galactosämieblut nicht nachweisbar, in dem ja die Uridyltransferase fehlt. Hier bewirkt Glucose sogar eine leichte Hemmung (-17 %). Als weiteres Indiz für die Richtigkeit dieser Theorie läßt sich anführen, daß der Glucose-Effekt in gereinigten Enzymextrakten nicht nachweisbar ist. Die Reinigung erfolgte durch Calcium-Phosphat-Extraktion mit anschließender Ammoniumsulfatfällung. Diese Extrakte enthalten praktisch keine Uridyltransferase mehr.

Positive Effekte wurden auch in adultem Gehirn (+ 100 %), in fetalem Gehirn (+ 9 %) und in fetaler Niere (+ 180 %) gefunden. Negative Effekte von ca. - 17 % waren in adulter und fetaler Leber und in fetalem Muskel zu beobachten. Keinen Effekt zeigte adulter Muskel (alle diese Gewebshomogenate waren vor der Messung dialysiert worden).

Offenbar sind die Art und die Ausprägung des Effektes stark von der Enzymausstattung des jeweiligen Organs abhängig.

5.2 Die Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung

5.2.1 AGIF

Die Ergebnisse aus den Isoelektrofokussierungsstudien an UDP-Galactose Pyrophosphorylase auf Agarose-Gelen sind in den Abb. 20, A, B, C und 19 wiedergegeben.

Zum Nachweis der Enzymaktivität von UDP-Galactose Pyrophosphorylase wurde in dieser Studie die Richtung 2 der Enzymreaktion benutzt. Wie schon die Kinetik erwarten ließ, zeigte das Enzym aus adulter Leber ein besonderes AGIF-Muster; hier waren mehrere Aktivitätsbanden nachweisbar, und zwar ein breites E1, relativ deutliche E3 und E4 und eine Spur von E2, außerdem einige verwischte Farbspuren im Bereich von pH 5,2 bis 5,5. Die Bande E1 in Erwachsenenleber war bereits nach 15-minütiger Inkubationszeit entwickelt, wohl aufgrund der großen Menge an applizierter Enzymaktivität. Andererseits dauerte es bei den übrigen Geweben und bei Erythrozyten außer dem fetalen Blut eine Stunde bis Banden sichtbar wurden.

Beim Erythrozytenenzym normaler Erwachsener und galactosämiekranker Patienten wurde außer einer scharfen E1-Bande in einigen Fällen eine Spur E2 beobachtet, ähnlich dem adulten Leberenzym. Auch in adulten Erythrozyten und in anderen adulten Geweben war in der Gegend von pH 5,2 bis 5,4 ein Schatten sichtbar. Das Enzym aus allen anderen adulten und fetalen Geweben einschließlich fetaler Erythrozyten ließ sich in zwei scharfe Banden, E1 und E2, auflösen.

Allgemein war im Falle der adulten Gewebe die Farbintensität von E1 größer als die von E2, wogegen bei fetalen Geweben E2 stärker ausgeprägt war. Dieser Unterschied fiel besonders bei den Blutproben auf, bei denen deutlich wurde, wie E1 im Verhältnis zu E2 mit dem Alter zunimmt.

Während Erwachsene wie erwähnt nur eine Spur von E2 in den Erythrozyten besitzen, wurde bei einigen Neugeborenen im Alter von wenigen Monaten ein relativ kräftiges E2 angefärbt (Abb. 20 B). Auch Heterozygote für Galactosämie wiesen in diesem Alter viel E2 auf (Abb. 20 C).

Uridyltransferase unterschied sich stark von UDP-Galactose Pyrophosphorylase. Uridyltransferase aus adulter Leber wurde durch AGIF in 8 Banden zwischen pH 5,5 und 6,0, Erythrozytenenzym in 4-7 Banden zwischen pH 5,1 und 5,6 aufgetrennt, je nach der Variante.

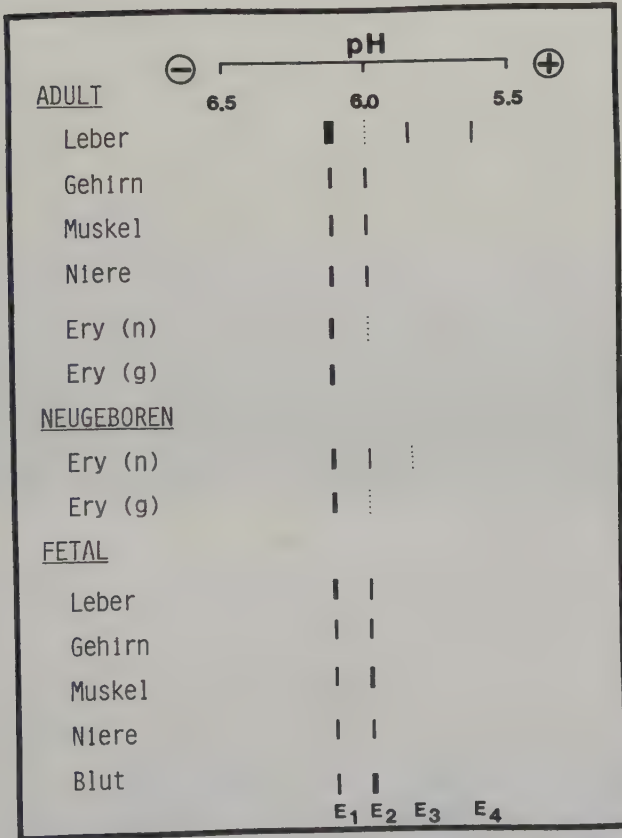
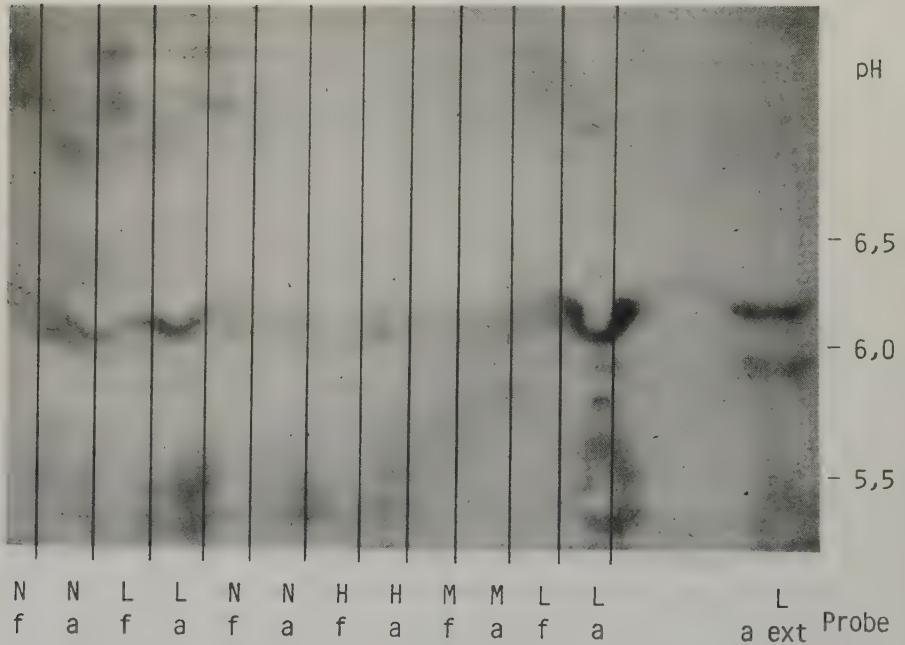


Abb. 19: AGIF-Muster der UDP-Galactose Pyrophosphorylase in menschlichen Geweben; Schema.

Ery = Erythrozyten
n = normales Blut
g = Galactosämie-Blut

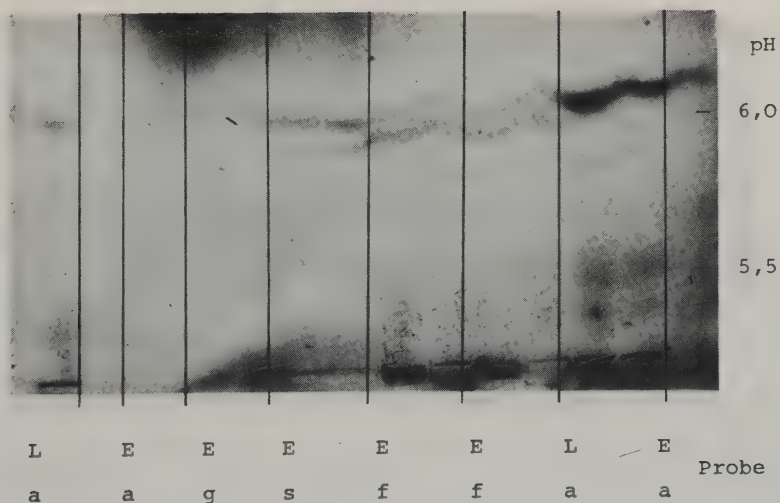
Abb. 20 A: AGIF der UDP-Galactose Pyrophosphorylase aus Geweben von Erwachsenen und Feten.



Proben: L = Leber
M = Muskel
H = Gehirn
N = Niere

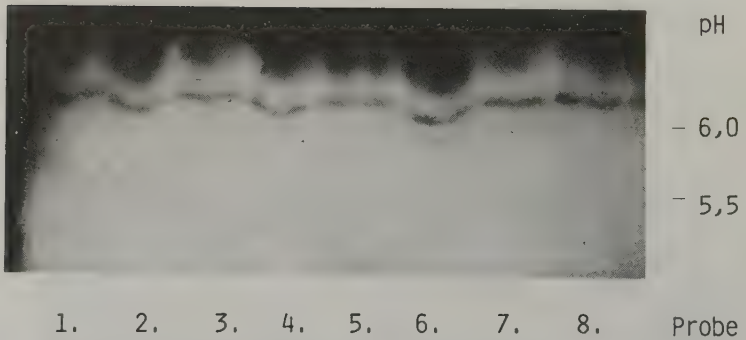
a = Erwachsene (adult)
f = fetal
ext = Ammoniumsulfatfraktion 35 - 45 % Sättigung

Abb. 20 B: AGIF der UDP-Galactose Pyrophosphorylase aus Erythrozyten von Erwachsenen, Feten, Säuglingen und Galactosämiekranken sowie aus adulter Leber.



Proben: L = Leber
 E = Erythrozyten
 a = adult
 f = fetal
 g = Galactosämieblut
 s = Säugling (1 Monat alt).

Abb. 20 C: AGIF der UDP-Galactose Pyrophosphorylase bei Erythrozyten von normalen Erwachsenen und Neugeborenen sowie von Homozygoten und Heterozygoten für Galactosämie.



Probe:

Alter:

1:	normale Erythrozyten,	24 Jahre
2:	" "	10 Tage
3:	" "	2 Wochen
4:	" "	4 Monate
5:	Heterozygot für Galactosämie	2 Wochen
6:	" " "	2 Monate
7:	Homozygot " "	1 Woche
8:	" " "	10 Tage

5.2.2 PAGIF

Einige vorläufige Untersuchungen wurden auf Polyacrylamid-Gelen mit einem pH-Bereich von 3,5 bis 9,5 durchgeführt. Als Proben wurden Ammoniumsulfatfraktionen von 35-45 % Sättigung aus adulter Leber benutzt, zum Vergleich auch solche von fetaler Leber. In Abbildung 21 sind die PAGIF-Muster der UDP-Galactose- und UDP-Glucose Pyrophosphorylase schematisch gegenübergestellt.

Die UDP-Galactose Pyrophosphorylase-Aktivität in adulter Leber konzentriert sich wie bei AGIF auf einen Bereich zwischen pH 5,6 und 6,2, während UDP-Glucose Pyrophosphorylase zahlreiche Aktivitätsbanden zwischen pH 5,5 und 7,5 aufweist, wobei die Hauptaktivität zwischen pH 6,3 und 7,2 liegt. Außerdem sind beide Enzymaktivitäten mit ähnlichen Mustern auch im Bereich von pH 4,8 bis 5,2 vertreten, wobei allerdings eine unspezifische Reduktion von NADP oder MTT in diesem Bereich nicht auszuschließen ist, zumal AGIF der UDP-Galactose Pyrophosphorylase hier außer Schatten niemals Banden zeigt, während andererseits auch bei Anfärbung der Uridyltransferase auf PAGIF (nicht gezeigt) an der gleichen Stelle eine Blaufärbung auftritt. Überdies ist zu bedenken, daß AGIF zur Darstellung sehr großer Proteine, wie es hier der Fall ist, besser geeignet ist als PAGIF. Auf Agarose-Gelen war es möglich, Rohextrakte zu trennen, während für PAGIF teilweise gereinigte Homogenate bzw. Hämolsate verwendet wurden. UDP-Glucose Pyrophosphorylase soll die Fähigkeit zur Bildung höherer Aggregate besitzen, deren Anteil an der Gesamtaktivität durch Fraktionierungsprozesse verändert werden könnte. Solche höheren Aggregate könnten für die Unterschiede zwischen den AGIF- und PAGIF-Mustern verantwortlich sein.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Banden der UDP-Glucose Pyrophosphorylase aus adulter Leber bei pH 5,6 bis 6,2 mit den Banden der UDP-Galactose, die auch im AGIF-Bild erscheinen, korrespondieren. Vergleiche auch Abb. 22 und 23 (Photos). Versuche mit fetalem Blut sowie Calcium-Phosphat-Fraktion 2 adulter Erythrozytenhämolsate zeigten genau wie AGIF zwei Banden für UDP-Galactose Pyrophosphorylase aus fetalen und nur eine Bande für das Enzym aus normalen adulten Erythrozyten (nicht gezeigt).

Abb 21: PAGIF-Muster von UDP-Glucose- und UDP-Galactose Pyrophosphorylase im Vergleich.

Probe: adulte Leber, Ammoniumsulfatfraktion 35 - 45 %

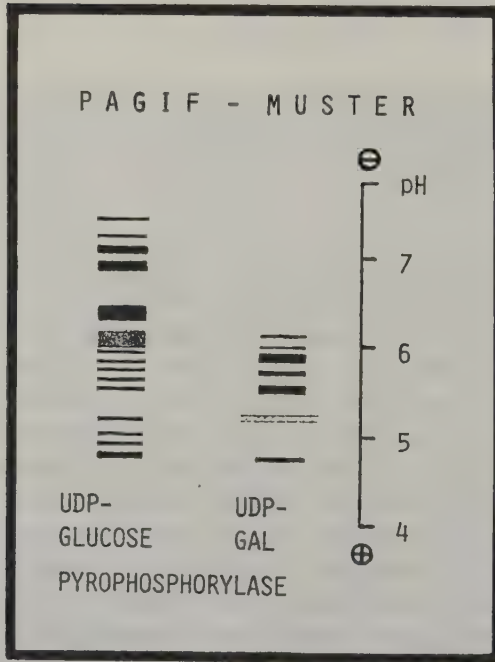


Abb. 22: UDP-Glucose Pyrophosphorylase aus adulter und fetaler Leber; PAGIF.

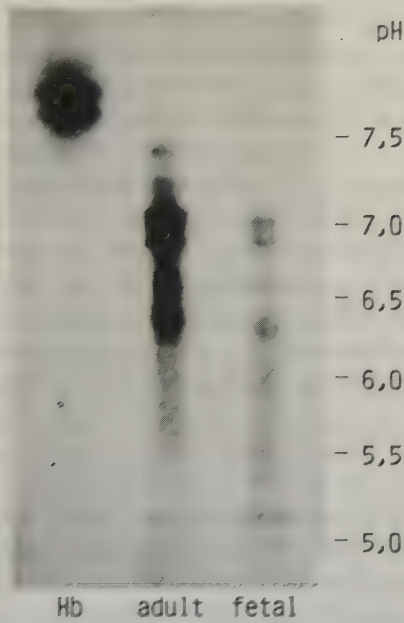
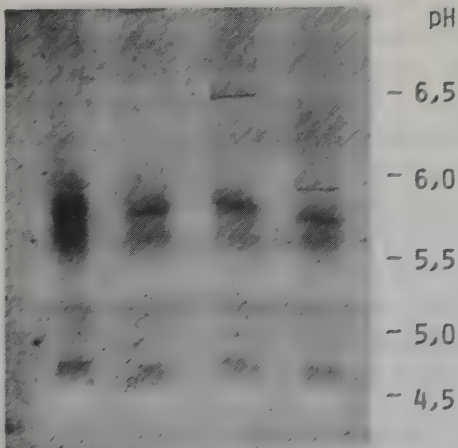


Abb. 23: UDP-Galactose Pyrophosphorylase aus adulter Leber; PAGIF



6. DISKUSSION

6.1 Zur Methodik

Die Ergebnisse aus der Fraktionierung der Homogenate und Hämolyse mit Calcium-Phosphat Gel und Ammoniumsulfat zeigen erwartungsgemäß, daß zumindest die Hauptfraktion des Enzyms UDP-Galactose Pyrophosphorylase keine Beziehung zur Uridyltransferase hat. Wie in der Einleitung (1.3, Seite 9 ff.) ausführlich beschrieben wurde, haben verschiedene Autoren Hinweise für eine strukturelle Identität der beiden Pyrophosphorylasen gefunden. Die bei der Calcium-Phosphat Extraktion aufgetretenen Aktivitätsverhältnisse von UDP-Glucose- und UDP-Galactose Pyrophosphorylase deuten dagegen auf die Existenz unterschiedlicher Enzymproteine hin, zumal auch die Stabilität beider Enzymaktivitäten während der Extraktion nicht identisch zu sein scheint.

Im einzelnen erkennt man bei Betrachtung der Tabelle 7 (Seite 66), daß sich die beiden Pyrophosphorylasen an das Gel binden, während Uridyltransferase nicht gebunden wurde. Die relativ niedrige Ausbeute bei den Pyrophosphorylasen kann durch Verluste bei dem intensiven Waschvorgang des beladenen Gels erklärt werden, bei dem Enzym in das leicht saure destillierte Wasser ausgespült worden sein kann. Die niedrige Ausbeute könnte auch auf eine Denaturierung des Enzyms durch die Calciumphosphatbehandlung hinweisen. Unterstellt man die Hypothese, daß die beiden Pyrophosphorylasen durch das gleiche Enzymprotein repräsentiert werden, so wäre die UDP-Glucose Pyrophosphorylase-Aktivität wesentlich unstabiler unter den Bedingungen der Gelbindung als die UDP-Galactose-Pyrophosphorylase-Aktivität¹. Dagegen ist der im Überstand verbliebene Anteil für beide Pyrophosphorylasen praktisch gleich.

Besonders auffällig ist jedoch die Tatsache, daß das Verhältnis der beiden Pyrophosphorylase-Aktivitäten zueinander in den verschiedenen Fraktionen nicht konstant blieb, sondern in der ersten Gelfraktion auf das Dreifache des Ausgangswertes anstieg, um in der zweiten Fraktion

¹ Vergleiche die 2. Fraktionen und die Gesamtgelbindung

auf die Hälfte abzufallen (Spalte A/B in Tab. 7, S. 66). Auch das Verhältnis der prozentualen Gelbindung (in Klammern) der 2. Fraktion zur Bindung in der 1. Fraktion war für UDP-Galactose Pyrophosphorylase 4,5-mal so hoch wie für UDP-Glucose Pyrophosphorylase. Diese beiden Beobachtungen könnten dafür sprechen, daß UDP-Glucose Pyrophosphorylase größere Affinität zum Gel besitzt als UDP-Galactose Pyrophosphorylase und deshalb auch früher (1. Fraktion) gebunden wird als UDP-Galactose Pyrophosphorylase-, die Stabilität im Zustand der Gelbindung wäre dann allerdings für letztere größer, wie oben schon diskutiert wurde.

Da nur ca. 71 % der Uridyltransferase im Überstand nachgewiesen werden konnten, der Rest aber offensichtlich auch nicht an das Gel gebunden war, muß angenommen werden, daß die fehlenden 27 % der Aktivität teilweise als Verunreinigung des Gels beim Waschvorgang verloren gingen (beachte den hohen Volumenanteil des Gels am Hämolystat!), teilweise wohl auch denaturiert wurden.

6.2 Zur Theorie

Bezüglich der Deutung der gebogenen Lineweaver-Burk-Diagramme können folgende Überlegungen angestellt werden (Vergleiche hierzu Abschnitt 4.4):

Unter der Annahme, daß die UDP-Galactose Pyrophosphorylase-Reaktion nach dem gleichen Reaktionsmechanismus abläuft wie die UDP-Glucose Pyrophosphorylase-Reaktion, d.h. daß ein geordnetes System vorliegt (siehe 4.2.4, Seite 48), scheidet die Möglichkeit eines Zufallsmechanismus aus (4.4.1, Seite 55). Systeme der letztgenannten Art können in Abhängigkeit von der Zahl der beteiligten enzymhaltigen Komplexe alle in dieser Untersuchung gefundenen Arten von doppelt reziproken Diagrammen hervorbringen.

Aufgrund der Ergebnisse der Elektrofokussierung (5.2, Seite 84 ff) kann die Existenz von mindestens zwei Isoenzymen angenommen werden. Sind zwei Isoenzyme mit unterschiedlichen Michaeliskonstanten

gleichzeitig wirksam, von denen beide für sich lineare Lineweaver-Burk-Diagramme ergeben, so entstehen rechtsgekrümmte (nach rechts offene hyperbolische) Lineweaver-Burk-Diagramme (siehe 4.4.2, Seite 55 sowie 4.3, Seite 51), wie sie unter den Kurven für Galactose-1-Phosphat als variables Substrat vertreten sind.

In Enzymsystemen mit Enzymproteinen, deren Quarternärstrukturen aus mehreren Untereinheiten bestehen, ist grundsätzlich auch die Möglichkeit von allosterischen und kooperativen Effekten gegeben (4.4.3, Seite 56). UDP-Glucose Pyrophosphorylase, also wahrscheinlich auch UDP-Galactose Pyrophosphorylase, ist bei Säugetieren mit großer Sicherheit ein Octamer (1.3, Seite 9). Die mit UTP als variablen Substrat erhaltenen nach oben offenen Parabeln im Lineweaver-Burk-Diagramm sind also höchstwahrscheinlich durch einen homotropen positiv kooperativen Effekt von UTP bzw. durch Substrataktivierung entstanden, zumal die in 4.4.4 (Seite 58) angedeutete Möglichkeit offensichtlich wegfällt.

Fetale Enzyme scheinen wesentlich stärker aktivierbar zu sein als adulte Enzyme; da jedoch die einzelnen Isoenzyme in adulten und in fetalen Geweben identisch zu sein scheinen, müßte die größere Aktivierbarkeit bei fetalen Organen auf dem größeren prozentualen Anteil an E2 beruhen. Demnach wäre also E2 das aktivierbare Isoenzym, das bei adulter Leber und Galactosämie-Erythrozyten fast völlig fehlt, weshalb diese Organe weitgehend lineare Lineweaver-Burk-Diagramme zeigen. Auffällig ist jedoch, daß adulter Muskel, der beide Isoenzyme enthält, durch eine rechtsgekrümmte Kurve charakterisiert ist, was für einen negativ kooperativen Effekt sprechen könnte.

Negativ kooperative Effekte können also die Kurven für Galactose-1-Phosphat als variablem Substrat vom fetalen Typ erzeugen. Auch eine Überlagerung mehrere Effekte (2 Isoenzyme!) kommt natürlich in Frage.

Diese Überlegungen machen deutlich, daß eine korrekte Berechnung der Enzymkonstanten für beide Substrate und beide Isoenzyme in einem derart komplexen System nicht möglich ist. Ein solches Bemühen wäre nur beim Vorliegen gereinigter Isoenzyme, z.B. nach präparativer

Elektrofokussierung sinnvoll. Dann wäre die Methode nach Florini und Vestling (4.2.1, Seite 45) für Systeme mit zwei Substraten und einem Enzym anwendbar.

Spezifische Aktivität und Kinetik

Unter den Geweben Erwachsener wurde die höchste spezifische Aktivität in Leber gefunden. Besonders interessant ist die Feststellung, daß auch in fetalen Geweben relativ hohe Aktivitäten ermittelt wurden, besonders im Fall der Erythrozyten, wo die Aktivität bei Feten sogar 5-7 mal höher war als bei Erwachsenen (Abb. 15, Seite 70). Die relativ hohen Aktivitätswerte bei Feten können teilweise durch die Krümmung der Lineweaver-Burk-Diagramme erklärt werden. Die Galactose-1-Phosphat Konzentration im Reaktionsgemisch des Routineansatzes betrug 1 mmol/l und lag damit weit unter dem K_m -Wert für das adulte Leberenzym. Mit dieser niedrigen Substratkonzentration ist aus einem gekrümmten Lineweaver-Burk-Diagramm ein höherer Aktivitätswert ablesbar als aus einem linearen Diagramm. Das bedeutet, daß mit zunehmender Krümmung der Lineweaver-Burk-Diagramme bei fetalen Organen die Enzymaktivität unter diesen Bedingungen steigt. Mit optimaleren, d.h. höheren Substratkonzentrationen im Reaktionsgemisch wäre der Unterschied zwischen adulten und fetalen Enzymaktivitäten wesentlich größer, die Aktivitäten bei den Organen von Erwachsenen wären relativ viel höher als diejenigen von fetalen Organen. Gleichwohl kann festgestellt werden, daß das fetale Enzym Galactose-1-Phosphat unter normalen physiologischen Bedingungen ebensogut zu metabolisieren vermag wie das adulte Enzym. In dieser Hinsicht ist auch die Beobachtung interessant, daß die Aktivität in galactosämischen Erythrozyten sogar höher ist als die Aktivität in normalen Erythrozyten, wenn Galactose-1-Phosphat-Konzentrationen über 2 mmol/l eingesetzt werden (vgl. Abb. 16 E, Seite 79). Bei guter diätetischer Therapie sollte allerdings die Galactose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrozyten Werte über 1 mmol/l nicht übersteigen (17, 87), obwohl die Konzentration in Nabelschnurblut und fetalem Blut etwas höher liegen mag.

In jedem Fall weisen diese kinetischen Daten auf die Existenz von mindestens zwei Isoenzymen mit unterschiedlicher Kinetik hin. Zur Erklärung der extrem gekrümmten Lineweaver-Burk-Diagramme für beide Substrate bei fetalen Organen müssen allerdings auch allosterische oder kooperative Effekte herangezogen werden, die den Einfluß der beiden Isoenzyme überlagern. Negative kooperative Effekte könnten die Kurven für Galactose-1-Phosphat, eine Substrataktivierung würde die aufwärts gekrümmten Diagramme für UTP erklären. Es kann spekuliert werden, ob E2 (siehe IEF) das allosterisch beeinflussbare Isoenzym ist, weil in adulter Leber und in galactosämischen Erythrozyten, wo ja fast ausschließlich E1 vorhanden ist, solche Effekte fehlen.

6.3 Zu den Ergebnissen

Identität von UDP-Glucose- und UDP-Galactose Pyrophosphorylase

Wie bereits mehrfach erwähnt, berichteten mehrere Autoren, daß UDP-Glucose- und UDP-Galactose Pyrophosphorylase sehr ähnlich seien oder daß es sich sogar um das gleiche Enzymprotein handeln soll (30, 31, 48, 94, 100). UDP-Glucose Pyrophosphorylase metabolisiert UDP-Glucose (die Richtung 2 nach Gl. 1, Seite 20) und Glucose-1-Phosphat (die Richtung 1 nach Gl. 1) mit annähernd gleicher Geschwindigkeit. UDP-Galactose Pyrophosphorylase setzt jedoch UDP-Galactose sehr viel schneller um als Galactose-1-Phosphat, wie in dieser Studie gezeigt wurde (vgl. K_{eq} , Seite 71). Dieser Befund unterstützt die Hypothese einer Identität. Betrachtet man nämlich den Reaktionsmechanismus (Gl. 10, Seite 49), so erkennt man, daß in beiden Reaktionsrichtungen die Nucleotidkomponente jeweils zuerst an das Enzym gebunden wird, im Falle der Rückreaktion also UDP-Galactose bzw. UDP-Glucose. Diese beiden Substrate scheinen sich in bezug auf die Bindungsstelle am Enzym wesentlich ähnlicher zu sein als die beiden Zuckerphosphate Glucose-1-Phosphat und Galactose-1-Phosphat, die in der Hinreaktion als zweites Substrat gebunden werden, was durchaus verständlich ist, weil ja bei ersteren die (identische) Nucleotidkomponente entscheidend für die Bindung ist. Die spezifische Aktivität des "Enzymproteins UDP-Glucose Pyrophosphorylase" wäre also für das "falsche Substrat" UDP-Galactose wesentlich größer als für Galactose-1-Phosphat, womit die unterschiedlichen Gleichgewichtskonstanten begründbar wären.

Überdies liegt der K_m für Galactose-1-Phosphat auffällig hoch, eigentlich zu hoch für das physiologische Substrat.

Das Gesagte trifft zumindest für das Isoenzym E1 zu, muß jedoch nicht unbedingt auch für E2 (oder weitere Isoenzyme) gelten. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Fraktionierungsstudien (siehe 6.1 Methodendiskussion) und der Isoelektrofokussierung (siehe nächsten Absatz), die gegen eine Identität der Enzyme sprechen, muß davon ausgegangen werden, daß beide Hypothesen richtig sein können, ohne sich gegenseitig auszuschließen, je nachdem welche Isoenzyme gerade betrachtet werden.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Richtung 2 war also im Falle der UDP-Galactose Pyrophosphorylase wesentlich höher als die der Richtung 1, was darauf hinweist, daß das Enzym unter physiologischen Bedingungen eher die Bildung als den Abbau von Galactose-1-Phosphat bewirkt. Nur bei extrem erhöhten Galactose-1-Phosphat-Spiegeln spielt die Reaktion 1 eine größere Rolle.

Die Isoelektrofokussierung von UDP-Glucose Pyrophosphorylase auf Polyacrylamid-Gel (PAGIF) zeigte multiple Banden zwischen pH 4,5 und 7,5, während UDP-Galactose Pyrophosphorylase in nur wenige Banden zwischen pH 4,7 und 6,1 aufgelöst wurde (5.2.2, Seite 89 ff). Es kann daher postuliert werden, daß UDP-Galactose Pyrophosphorylase ein Teil von UDP-Glucose Pyrophosphorylase, aber nicht identisch mit ihr ist. Die Bedeutung einiger Banden zwischen pH 4,7 und 5,3, die bei den drei untersuchten Enzymen in ähnlicher Weise auftraten, konnte nicht geklärt werden, eine unspezifische Reduktion von NADP in diesem Bereich durch eine Dehydrogenase ist jedoch nicht auszuschließen, zumal AGIF hier keine klaren Banden zeigte, lediglich undeutliche Schatten bzw. Schmierzonen. Wie schon aufgrund der Fraktionierungsstudien angenommen wurde, waren die AGIF-Muster von UDP-Galactose Pyrophosphorylase und Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase ganz verschieden.

AGIF von UDP-Galactose Pyrophosphorylase (Abb. 19 und 20, Seite 85 ff) identifizierte in den meisten Organen zwei Hauptbanden (E1 bei pH 6,1 und E2 bei pH 6,0), mit Ausnahme von adulter Leber, in

der zwei weitere Aktivitätsbanden nachweisbar waren (pH 5,85 bzw. 5,65). Die Enzyme aus adulter Leber sowie aus Erythrozyten Erwachsener und Galactosämiekranker enthielten kein E2 oder höchstens eine Spur davon. Diese Ergebnisse aus AGIF korrelieren gut mit den Resultaten der kinetischen Studien. Nur die Enzyme aus adulter Leber und aus galactosämischen Erythrozyten lieferten nämlich völlig lineare Lineweaver-Burk-Diagramme für Galactose-1-Phosphat, und auch das Enzym aus normalen Erythrozyten ließ beinahe lineares Aktivitätsverhalten erkennen, im Unterschied zu den meisten übrigen Gewebsenzymen. Außerdem war zu beobachten, daß in fetalen Geweben die Intensität von E2 ganz allgemein größer war als die von E1, während in den entsprechenden Geweben Erwachsener E1 etwas stärker ausgeprägt war. Bei Erythrozyten wurde E2 mit steigendem Alter schwächer, während sich E1 intensiver färbte.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann postuliert werden, daß das Isoenzym E2 für die Konvexität der Lineweaver-Burk-Diagramme verantwortlich sein könnte, wobei die Substrataffinität bezüglich Galactose-1-Phosphat bei E2 wesentlich größer sein müßte als bei E1. Die Beobachtung, daß kräftige E2-Banden in Erythrozyten einerseits bei Neugeborenen auftreten, die ja einer hohen Galactosebelastung ausgesetzt sind, andererseits auch bei Heterozygoten für Galactosämie, bei denen der Leloir-Weg nur eingeschränkt funktionstüchtig ist, gibt außerdem Anlaß zu der Vermutung, daß E2 ein induzierbares Enzym sein könnte.

Leider ist ein direkter Vergleich der kinetischen Daten mit Resultaten aus der Isoelektrofokussierung nicht möglich, weil der Aktivitätsnachweis bei den Untersuchungen mit Hilfe der entgegengesetzten Richtungen der Enzymreaktion durchgeführt wurde, d.h. in den kinetischen Studien wurde Richtung 1 untersucht, während bei der IEF Richtung 2 benutzt wurde (siehe Methoden). Bei der AGIF adulter Leber erschien ein sehr kräftiges E1, das sehr schnell angefärbt wurde. Ein Überschuß an Enzymaktivität könnte für die anderen in adulter Leber nachweisbaren Banden, E3 und E4, als auch evtl. für die Schmierzone in der Gegend niedriger pH-Werte verantwortlich sein (siehe oben). Gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Organen waren im Aktivitätsverhältnis der beiden Richtungen der Enzymreaktion erkennbar (5.1.8, Seite 71). Das Verhältnis war im Falle der adulten

Leber und der Erythrozyten am höchsten, was als Hinweis darauf zu werten ist, daß hier ein Isoenzym oder Isoenzyme überwiegen, die Richtung 2 besonders effizient katalysieren. Leider konnte dieses Verhältnis nicht in fetalen Erythrozyten bestimmt werden, in denen die Messung der Richtung 1 eine gegenüber adulten Erythrozyten 5 - 7 mal höhere Aktivität ergeben hatte. Lediglich daraus, daß die Banden bei fetalen Blutproben nur 2 - 3 mal schneller gefärbt wurden als bei den adulten Proben, kann angenommen werden, daß das Verhältnis hier unter 10 liegen könnte.

Gewisse Unterschiede in der Stabilität beim Einfrieren und in der Aktivierbarkeit durch DTT stellten das adulte Nierenenzym als besonders auffällig heraus, es war aber bisher nicht möglich, diese Befunde mit den übrigen Daten in einen klaren Zusammenhang zu stellen (Vgl. 5.1.3, Seite 62 und 5.1.4, Seite 64).

Adultes Nierenenzym scheint nämlich einerseits besonders instabil, andererseits aber auch durch DTT besonders stark (re-)aktivierbar zu sein. Ob dies auf dem besonders hohen Anteil an E_2 im Nierengewebe beruht, oder aber auf besonderen Verhältnissen im Nierengewebe und -homogenat, die zur Labilisierung der Enzymstruktur führen, ist nicht bekannt.

Fakten und Forderungen können wie folgt zusammengefaßt werden:

Erstens nimmt der Anteil an E_2 mit steigendem Alter ab, zweitens steigt das Verhältnis von Richtung 2 zu Richtung 1, und drittens nimmt die Krümmung der Lineweaver-Burk-Diagramme ab. Das bedeutet, daß E_2 die Richtung 1 wohl relativ stärker katalysiert als E_1 , E_1 und die anderen Isoenzyme dagegen mehr die Richtung 2 bevorzugen. E_2 , die fetale Form, hat wahrscheinlich eine wesentlich größere Affinität zu Galactose-1-Phosphat, ist in fetalen Geweben allosterisch beeinflußt und ruft so die gekrümmten Lineweaver-Burk-Diagramme hervor. E_2 könnte außerdem ein induzierbares Enzym sein, das in dem Maße mit steigendem Alter aus Leber und Erythrozyten verschwindet, wie die Galactose-1-Phosphat-Konzentration im Organismus abnimmt. Die vielleicht interessanteste Beobachtung ist die, daß E_2 in den Erythro-

zyten galactosämiekranker Neugeborener im Gegensatz zu normalen Neugeborenen kaum vorkommt. Die Lineweaver-Burk-Diagramme für Galactose-1-Phosphat bei Erythrozyten Galactosämiekranker waren linear wie die für Leber Erwachsener. Aus diesem Grund war die Aktivität bei 1 mmol/l Galactose-1-Phosphat niedriger als normal. Außerdem fehlte die bei normalen Kindern im nachgeburtlichen Leben übliche Aktivitätsabnahme bei Galactosämiekranken, die mit einer Abnahme von E2 bei normalen Kindern zu korrelieren ist. Bedauerlicherweise war es nicht möglich, die Aktivität in fetalen Erythrozyten bei Galactosämie zu bestimmen, um diese Aussage auch für die Fetalzeit bestätigen zu können, in der normalerweise ein starker Aktivitätsabfall der UDP-Galactose Pyrophosphorylase einhergeht mit einem erheblichen Verlust an E2. Falls jedoch diese Vermutung zutrifft, könnte das Fehlen oder ein Mangel an E2 ein kritischer Faktor für den Galactose-1-Phosphat-Metabolismus und für die Ausbildung pathologischer Symptome bei Galactosämie während der Neugeborenen- und Fetalzeit darstellen.

Die gesamte Enzymaktivität der Leber, repräsentiert vor allem durch E 1, nimmt bei Galactosämiekranken und Gesunden im Laufe des pränatalen Lebens im gleichen Ausmaß zu und bleibt postnatal konstant.

Entscheidend für die Ausbildung von Krankheitssymptomen, die mit den Gewebekonzentrationen von Galactose-1-Phosphat korrelieren, ist aber weniger die Gesamtaktivität als das Gleichgewicht der reversiblen Reaktion, das bei Gesunden im pränatalen Leben wesentlich weiter auf der Seite von UDP-Galactose liegt als nach der Geburt, das sich aber auch dann noch in Richtung des Galactose-1-Phosphats verschiebt.

Vermittelt wird diese Gleichgewichtsverschiebung durch eine Änderung der Isoenzymmuster in den Organen und im Blut, möglicherweise spielen auch andere Effekte am Enzymmolekül eine Rolle. Ob diese Veränderungen einer abnehmenden Galactose-Belastung, einem Sinken des UDP-Galactose-Bedarfs oder einer steigenden Toleranz der Zellen gegenüber toxischem Galactose-1-Phosphat Rechnung tragen, ist unbekannt. Jedoch scheint es so, als ob Galactosämiekranken diese adaptativen oder regulativen Vorgänge nicht vollziehen können, weil das

Isoenzym E 2 zumindest vermindert ist. E 2 sorgt bei normalen Kindern und Feten auch bei großer Galactosebelastung für eine Gleichgewichtseinstellung, die von dem toxischem Galactose-1-Phosphat wegführt.

Das Aktivitätsverhältnis beider Reaktionsrichtungen zueinander müßte dann besonders in dieser Zeit noch weiter zugunsten der Synthese von toxischem Galactose-1-Phosphat verschoben sein als normalerweise.

Es kann daher gefolgert werden, daß die Fetal- und Neugeborenenperiode die gefährlichste Zeit im Leben des Galactosämiekranken darstellen, weshalb gerade in diesen Perioden besondere Vorsicht angezeigt ist.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Um das Vorkommen wachsender Galactosetoleranz mit steigendem Alter bei Galactosämiekranken zu erklären, wurde die UDP-Galactose Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.10) in verschiedenen menschlichen Geweben einschließlich Blut von Erwachsenen und Feten untersucht, wobei besonderes Augenmerk auf das Erythrozytenenzym galactosämiekranker Patienten und gesunder Kontrollen in Abhängigkeit vom Lebensalter gelegt wurde.

Die bei den kinetischen Studien benutzte Isotopenmethode benutzte die Bildung von UDP-(^{14}C)Galactose durch Rohextrakte unter Einbeziehung der Ionenaustauscherchromatographie auf Mini-DEAE-Cellulose-Säulen und verwendete DTT als Aktivator bei einem pH-Optimum von 7,9 bis 8,0.

Unsere Isoelektrofokussierungsstudien und Extraktionsversuche mit Calcium-Phosphat Gel haben Indizien gegen eine Identität von UDP-Glucose- und UDP-Galactose Pyrophosphorylase erbracht. Der optimale Sättigungsbereich für beide Pyrophosphorylasen zur Fraktionierung von Gewebshomogenaten mit Ammoniumsulfat lag zwischen 35 und 45 %.

Die spezifische Aktivität der UDP-Galactose Pyrophosphorylase (Synthese von UDP-Galactose) war mit 1,09 nmol/min·mg Protein in adulter Leber weitaus am höchsten. Außer im Falle der Leber, wo die Aktivität der adulten Gewebe diejenige der fetalen deutlich überstieg, konnten kaum Unterschiede in der Enzymaktivität von Erwachsenen und Feten (unter Standardbedingungen) festgestellt werden. Fetales Blut enthielt sogar eine 5 - 7 mal höhere Aktivität als adultes Blut, und die Aktivität in Erythrozyten von Gesunden nahm mit dem Alter leicht ab. Bei Galactosämie war sie etwas geringer als normal bei normaler Leberaktivität, außerdem fehlte der postnatale Abfall.

Für alle Gewebe wurden Lineweaver-Burk-Diagramme angefertigt. Die Kurven für Leber Erwachsener und galactosämische Erythrozyten waren als einzige für beide Substrate linear. Der K_m für Galactose-1-Phosphat lag bei adulter Leber mit ca. 40 mM sehr hoch, für UTP mit ca. 0,06 mM wesentlich niedriger. Alle anderen Organe wiesen gebogene Diagramme auf, für Galactose-1-Phosphat waren sie rechts-

konvex gekrümmt, für UTP meist paraboloid nach oben gebogen, wobei beide Krümmungsformen bei den fetalen Geweben wesentlich stärker ausgeprägt waren, bei denen wahrscheinlich kooperative Effekte eine größere Rolle spielen.

Die Ergebnisse der Isoelektrofokussierung lassen in Zusammenschau mit den kinetischen Daten die Existenz von mindestens zwei Isoenzymen der UDP-Galactose Pyrophosphorylase als bewiesen erscheinen, wobei K_1 mit der Michaeliskonstanten des adulten Leberenzym für Galactose-1-Phosphat identisch sein dürfte und K_2 bei 0,6 mM liegen müßte. Bei Isoelektrofokussierung auf Agarose-Gel enthalten alle Organe zwei Isoenzyme E1 (pH = 6,1) und E2 (pH = 6,0) in wechselnden Relationen. Bei adulter Leber färbten sich zwei weitere Banden, hier war allerdings wie bei Erythrozyten von Erwachsenen und Galactosämiekranken nur eine Spur E2 nachweisbar, was die linearen Lineweaver-Burk-Diagramme erklärt, während stärkere Zumischung von E2 gekrümmte Diagramme bewirkt. Fetale Gewebe enthalten durchweg einen höheren Anteil an E2 als die entsprechenden adulten Gewebe, besonders deutlich ist dies beim Erythrozytenenzym.

In adulter Leber und in Erythrozyten war K_{eq} mit über 40 am höchsten, was darauf hinweist, daß E1 bevorzugt die Bildung und E2 den Verbrauch von Galactose-1-Phosphat katalysiert. Infolge der höheren Affinität von E2 zu Galactose-1-Phosphat muß ein Mangel an E2 bei Galactosämie ein entscheidender Faktor für die Anhäufung von Galactose-1-Phosphat sein. Die Einstellung des Reaktionsgleichgewichts weicht bei kranken Feten und Kindern stark von der Norm ab und muß sich deshalb bei ihnen besonders verhängnisvoll auswirken.

8. ABKÜRZUNGEN UND ERKLÄRUNGEN

A, B:	Substrate
ADP:	Adenosindiphosphat
AGIF:	Agarose-Gel-Isoelektrofokussierung
ATP:	Adenosintriphosphat
E:	Enzym
Gal-1-P:	Galactose-1-Phosphat
Glu-1-P:	Glucose-1-Phosphat
IEF:	Isoelektrofokussierung
K_{eq} :	Gleichgewichtskonstante
K_i :	Inhibitorkonstante
K_m :	Michaeliskonstante
K_s :	Dissoziationskonstante des Substrates S vom Enzym
NADP ⁺ :	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, oxidiert
NADPH·H ⁺ :	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
PAGIF:	Polyacrylamid-Gel-Isoelektrofokussierung
PPi:	anorganisches Pyrophosphat
[S]:	Substratkonzentration
UDP:	Uridindiphosphat
UDP-Gal:	Uridindiphosphat-Galactose
UDP-Glu:	Uridindiphosphat-Glucose
UTP:	Uridintriphosphat
v:	Reaktionsgeschwindigkeit
V:	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X:	übertragene Gruppe
$\bar{x} \pm SD$; n:	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; Anzahl.

9. LITERATUR

- [1] H.D. Abraham und R.R. Howell: Human Hepatic Uridine Diphosphate Galactose Pyrophosphorylase: Its Characterization and Activity During Development. *J. Biol. Chem.*, 244, (1969), 545 - 550.
- [2] G.J. Albrecht, S.T. Bass, L.L. Seifert, und R.G. Hansen: Crystallization and Properties of Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase from Liver. *J. Biol. Chem.*, 241, (1966), 2968 - 2975.
- [3] D.H. Anderson: Miscellaneous Disorders of Metabolism: V. Glycogen Storage Disease and Galactosemia. In: *Biochemical Disorders in Human Disease* von R.H.S. Thompson and E.J. King (Hrsg.). Churchill Ltd., London, (1957), 695.
- [4] E.P. Anderson, H.M. Kalckar und K.J. Isselbacher: A Specific Enzymatic Assay for the Diagnosis of Congenital Galactosemia. *J. Lab. Clin. Med.*, 50 (1957), 469 - 477.
- [5] R.D. Berlin: Specificities of Transport Systems and Enzymes: Selectivity of Cells for Exogenous Compounds is Enhanced by Sequential Action of Membrane Carriers and Enzymes. *Science*, 168, (1970), 1539 - 1545.
- [6] E. Beutler und M.C. Baluda: A Simple Spot Screening Test for Galactosemia. *J. Lab. Clin. Med.*, 68, (1966), 137.
- [7] H. Bickel, C. Bachmann, R. Beckers, N.J. Brandt, B.E. Clayton, G. Corrado, H.J. Feingold, O. Giardini, G. Hammersen, D. Schönberg: Neonatal Mass Screening for Metabolic Disorders. Summary of Recent Sessions of the Committee of Experts to Study Inborn Metabolic Diseases, Public Health Committee, Council of Europe. *Europ. J. Pediatrics*, 137, (1982), 133.
- [8] M.K. Binder, J.C. Petricciani, C.R. Merrill und M.R. Geier: Aspects of Galactose Metabolism in Normal and Galactosemic Cell Cultures. *Medical Annals of the District of Columbia*, 41, (1972), 228 - 230.
- [9] W.G. Burgerhout, A.P.M. Jongsma, J. de Wit, H. van Someren und P. Meera Khan: Regional Mapping of Seven Enzyme Loci on Human Chromosome 1 by Use of Somatic Cell Hybridization. *Cytogen. Cell Gen.*, 14, (1975), 260 - 262.
- [10] C.M. Chacko, L. McCrone und H.L. Nadler: Uridine Diphosphoglucose Pyrophosphorylase and Uridine Diphosphogalactose Pyrophosphorylase in Human Skin Fibroblasts Derived From Normal and Galactosemic Individuals. *Biochim. Biophys. Acta*, 268, (1972), 113 - 120.

- [11] D.C. Cusworth, C.E. Duct und F.V. Flynn: The Amino-Aciduria in Galactosemia. Arch. Dis. Child., 30, (1955), 150 - 154.
- [12] F.J. De Toma, K.E. Kindwall und C.A. Reardon: The Effect of Tosyllisine Chloromethyl Ketone on the Activity of Uridine Diphosphoglucose Pyrophosphorylase of the Cellular Slime Mold Dictyostelium Discoideum. Diophys. Res. Comm., 74, (1977), 350 - 355.
- [13] H.J. Deuel: The Lipids, their Chemistry and Biochemistry II. Biochemistry; Digestion, Absorption, Transport and Storage. Interscience, New York, (1955), 741.
- [14] W.C. Dillard und L. Graf: Properties of UDP-Glucose Pyrophosphorylase from Acetabularia Mediterranea, Abstract. Eur. J. Cell Biol., 20, (1979), 128 - 129.
- [15] M. Dixon und E.C. Webb: Enzymes, 3. Auflage, Longmans, Green and Co., London, (1979).
- [16] G. Donnell, W. Bergren, G. Perry und R. Koch: Galactose-1-Phosphate in Galactosemia. Pediatrics, 31, (1963), 802 - 810.
- [17] G. N. Donnell, W.R. Bergren und W.G. Ng: Galactosemia. Biochem. Med., 1, (1967), 29 - 53.
- [18] F. Eisenberg, Jr., K.J. Isselbacher und H.M. Kalckar: Studies on Metabolism of Carbon-14-Labeled Galactose in a Galactosemic Individual. Science, 125, (1957), 116 - 117.
- [19] T.D. Elder, S. Segal, E.S. Maxwell und Y. S. Topper: The Progesterone-Like Effects of Menthol on Galactose Metabolism. Fed. Proc., 19, (1960), 53.
- [20] K. Fishler, G.N. Donnell, W.R. Bergren und R. Koch: Intellectual and Personality Development in Children with Galactosemia. Pediatrics, 50, (1972), 412 - 419.
- [21] H. Flodgaard: Isotope Derivative Method for Determination of Microquantities of Inorganic Pyrophosphate in Biological Material. Eur. J. Biochem., 15, (1970), 273 - 279.
- [22] J. Folch-Pi: Composition of the Brain in Relation to Maturation, In: Biochemistry of Developing Nervous System von H. Walsch (Hrsg), Acad. Press, New York, (1955), 125.
- [23] T.B. Friedman, R.J. Yarkin und C.R. Merril: Galactosemia and Galactonolactone: Further Biochemical Observations. Science, 183, (1974), 764 - 765.
- [24] T.B. Friedman, R.J. Yarkin und C.R. Merril: Galactose and Glucose Metabolism in Galactokinase Deficient, Galactose-1-Phosphate Uridyl Transferase Deficient and Normal Human Fibroblasts. J. Cell. Physiol., 85, (1975), 569 - 578.

- [25] R. Gitzelmann: Hereditary Galactokinase Deficiency: A Newly Recognized Course of Juvenile Cataracts. *Pediat. Res.*, 1, (1967), 14.
- [26] R. Gitzelmann: Estimation of Galactose-1-Phosphate in Erythrocytes: A Rapid and Simple Enzymatic Method. *Clin. Chim. Acta*, 26, (1969), 313 - 316.
- [27] R. Gitzelmann: Formation of Galactose-1-Phosphate from Uridine Diphosphate Galactose in Erythrocytes from Patients with Galactosemia. *Pediat. Res.*, 3, (1969), 279 - 286.
- [28] R. Gitzelmann und S. Auricchio: The Handling of Soya Alpha Galactosides by a Normal and a Galactosemic Child. *Pediatrics*, 36, (1965), 231 - 235.
- [29] R. Gitzelmann, H.C. Curtius und I. Schneller: Galactitol and Galactose-1-Phosphate in the Lens of a Galactosemic Infant. *Exp. Eye Res.*, 6 (1967), 1.
- [30] R. Gitzelmann und R.G. Hansen: Galactose Biogenesis and Disposal in Galactosemics. *Biochim. Biophys. Acta*, 372, (1974), 374 - 378.
- [31] R. Gitzelmann, R.G. Hansen und B. Steinmann: Biogenesis of Galactose, a Possible Mechanism of Self-Intoxication in Galactosemia. In: *Normal and Pathological Development of Energy Metabolism*, von F.A. Hommes and C.J. Van den Berg (Hrsg.), Academic Press, London, (1975), 25 - 38.
- [32] F. Goppert: Galactosemia. *Klin. Wschr.*, 54 (1917), 473
- [33] C. Granzow, M. Kopun und H.P. Zimmermann: Role of Nuclear Glycogen-Synthetase and Cytoplasmatic UDP-Glucose Pyrophosphorylase in the Biosynthesis of Nuclear Glycogen in HD33 Ehrlich-Lettre Ascites Tumor-Cells. *J. Cell Biol.*, 89, (1981), 475 - 484.
- [34] J.G. Gray, W.B. Pratt und L. Aronow: Effects of Glucocorticoids on Hexose Uptake by Mouse Fibroblasts in Vitro. *Biochemistry* 10, (1971), 277 - 284.
- [35] D.D. Hames und B.A. Hodson: Accumulation of UDP-Glucose Pyrophosphorylase by Axenically Grown Amoebae of *Dictyostelium Discoideum*. *Biochem. J.*, 177, (1979), 21 - 28.
- [36] R.G. Hansen, G.J. Albrecht, S.T. Bass, und L.L. Seifert: UDP-Glucose Pyrophosphorylase (Crystalline) from Liver. In: *Methods in Enzymology*, 8, (1966), von S.P. Colowick und N.O. Kaplan (Hrsg.). Acad. Press, New York, 248 - 152.
- [37] M. R. Heinrich und S.M. Haward: Galactokinase. *Meth. Enzym.*, 9, (1966), 407 - 412.
- [38] H.Z. Hill und T.T. Puck: Detection of Inborn Errors of Metabolism: Galactosemia. *Science*, 179, (1973), 1136 - 1139.

- [39] A. Holzel, G.M. Komrower und V.K. Wilson: Aminoaciduria in Galactosemia. *Brit. Med. J.*, 1 (1952), 194 - 195.
- [40] D.Y. Hsia: Galactosemia. Charles C. Thomas, Springfield, Ill., (1969).
- [41] K.J. Isselbacher: Evidence for an Accessory Pathway of Galactose Metabolism in Mammalian Liver. *Science*, 126, (1957), 651 - 654.
- [42] K.J. Isselbacher: A Mammalian Uridinediphosphate Galactose Pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.*, 232, (1958), 429 - 444.
- [43] K. J. Isselbacher, E.P. Anderson, K. Kurahashi und H.M. Kalckar: Congenital Galactosemia, a Single Enzymatic Block in Galactose Metabolism. *Science*, 123, (1956), 635 - 636.
- [44] H.M. Kalckar: Uridinediphospho Galactose Metabolism, Enzymology, and Biology. In: *Advances in Enzymology XX*, Interscience, New York, (1958), 111 - 134.
- [45] H.M. Kalckar, E.P. Anderson und K.J. Isselbacher: Galactosemia, a Congenital Defect in Nucleotide Transferase. *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (Amst.), (1956), 262 - 268.
- [46] H.M. Kalckar, B. Braganca und A. Munch-Peterson: Uridyl Transferase and the Formation of Uridine Diphosphogalactose. *Nature*, 172, (1953), 1038 - 1039.
- [47] H.N. Kirkman und E.S. Maxwell: Enzymatic Estimation of Erythrocyte Galactose-1-Phosphate. *J. Lab. Clin. Med.*, 56, (1960), 161.
- [48] J.K. Knop und R.G. Hansen: Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase: Crystallisation and Properties of the Enzyme from Human Liver. *J. Biol. Chem.*, 245, (1970), 2499 - 2504.
- [49] G.M. Komrower und D.H. Lee: Long-Term Follow-Up of Galactosemia. *Arch. Dis. Child.*, 45, (1970), 367 - 373.
- [50] G.M. Komrower, V. Schwarz, A. Holzel und L. Golberg: A Clinical and Biochemical Study of Galactosemia. A Possible Explanation of the Nature of the Biochemical Lesion. *Arch. Dis. Child.*, 31, (1956), 254 - 264.
- [51] L.P. Kozak und W.W. Wells: Effect of Galactose on Energy and Phospholipid Metabolism in the Chick Brain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 135, (1969), 371 - 377.
- [52] L.P. Kozak und W.W. Wells: Studies on the Metabolic Determinants of D-Galactose-Induced Neurotoxicity in the Chick. *J. Neurochem.*, 18, (1971), 2217 - 2228.
- [53] R.S. Krooth und A.N. Weinberg: Properties of Galactosemic Cells in Culture. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 3, (1960), 518 - 524.

- [54] R.S. Krooth und A.N. Weinberg: Studies on Cell Lines Developed from the Tissues of Patients with Galactosemia. *J. Exp. Med.*, 113, (1961), 1155 - 1171.
- [55] L. Lee, A. Kimura und T. Tochikura: Presence of a Single Enzyme Catalyzing the Pyrophosphorolysis of UDP-Glucose and UDP-Galactose in *Bifidobacterium Bifidum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 527, (1978), 301 - 304.
- [56] L.F. Leloir: The Metabolism of Hexosephosphates. In: *Phosphorus Metabolism. A Symposium on the Role of Phosphorus in the Metabolism of Plants and Animals*, von W.D. McElroy and B. Glass (Hrsg.). John Hopkins, 1, (1951), 67 - 93.
- [57] S. Levine, T.A. Gillett, E. Hagemann und R.G. Hansen: Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase. II. Polymeric and Subunit Structure. *J. Biol. Chem.*, 244, (1969), 5729 - 5734.
- [58] H. Lineweaver und D. Burk: The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, (1934), 658 - 666.
- [59] LKB-Informationen über Isoelektrische Fokussierung auf Flachbettgelen.
- [60] M. London, J.H. Marymont, jr. und J. Fuld: A. Micro-diffusion¹⁴ Test for Congenital Galactosemia Utilizing Galactose-1-C. *Pediatrics*, 33, (1964), 421 - 424.
- [61] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, (1951), 265 - 275.
- [62] C.L. Markert und F. Møller: Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic and Species Specific Patterns. *Proc. nat. Acad. Sci., (Wash.)*, 45, (1959), 753 - 763.
- [63] H.H. Mason und M.E. Turner: Chronic Galactosemia. *Am. J. Dis. Child.*, 50, (1935), 359.
- [64] J.S. Mayes und L.R. Miller: The Metabolism of Galactose by Galactosemic Fibroblasts in Vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 313, (1973), 9-16.
- [65] I.T. Oliver: Inhibitor Studies on Uridine Diphosphoglucose Pyrophosphorylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 52, (1961), 75 - 81.
- [66] L.A. Pesch, S. Segal und Y.J. Topper: Progesterone Effects on Galactose Metabolism in Prepubertal Patients with Congenital Galactosemia and in Rats Maintained on High Galactose Diets. *J. Clin. Invest.*, 39, (1960), 178.
- [67] J.C. Petricciani, M.K. Binder, C.R. Merrill und M.R. Geier: Galactose Utilization in Galactosemia. *Science*, 175, (1972), 1368 - 1370.

- [68] W.R. Pickering und R.R. Howell: Galactokinase Deficiency: Clinical and Biochemical Findings in a New Kindred. *J. Pediatrics*, 81, (1972), 50 - 55.
- [69] A. Robinson: The Assay of Galactokinase and Galactose-1-Phosphate Uridyl Transferase Activity in Human Erythrocytes. *J. Exp. Med.*, 118, (1963), 359 - 370.
- [70] J.D. Russell: Improved Transferase Assay for Cultured Fibroblasts. *Biochem. Gen.*, 1, (1968), 301 - 303.
- [71] J.D. Russell und R. De Mars: UDP-Glucose: α -D-Galactose-1-Phosphate Uridyl Transferase Activity in Cultured Human Fibroblasts. *Biochem. Genetics*, 1, (1967), 11024.
- [72] B. Sadurska und T. Szymczyk: Properties of UDPG Pyrophosphorylase from Rat Salivary Glands and Liver. *Archs. oral Biol.*, 23, (1978), 639 - 646.
- [73] J. Schaub und M. Osang: Angeborene Enzymdefekte des Kohlenhydratstoffwechsels: Ihre Bedeutung für die klinische Padiatrie und die biochemische Humangenetik. *Münch. Med. Wschr.*, 118 (1976), 609 - 610.
- [74] J. Schaub, Y. Shin-Bühring, B. Wiese, P. Rahm, B. Haas: Metabolism of Galactose and Accumulation of Galactose-1-Phosphate in Various Cell Types of Cultured Fibroblasts for Galactosemia. In: *Models for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, von F.A. Hommes (Hrsg.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, (1979), 319 - 327.
- [75] V. Schwarz und L. Golberg: Galactose-1-Phosphate in Galactose Cataract. *Biochim. Biophys. Acta*, 18, (1953), 310 - 316.
- [76] V. Schwarz, L. Golberg, G.M. Komrower und A. Holzel: Some Disturbances of Erythrocyte Metabolism in Galactosemia. *Biochem. J.* (1956), 34 - 40.
- [77] S. Segal: Disorders of Galactose Metabolism. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3. Auflage von J.B. Stanberry, J.B. Wyngaarden und D.S. Fredrickson (Hrsg.), McGraw Hill, New York (1972), 174.
- [78] S. Segal, A. Blair und H. Roth: The Metabolism of Galactose by Patients with Congenital Galactosemia. *Am. J. Med.*, 38, (1965), 62 - 70.
- [79] S. Segal, A. Blair und Y.J. Topper: Oxidation of Carbon-14-Labeled Galactose by Subjects with Congenital Galactosemia. *Science*, 136, (1962), 150 - 151.
- [80] S. Segal und P. Cuatrecasas: The Oxidation of C¹⁴-Galactose by Patients with Congenital Galactosemia. *Am. J. Med.*, 44, (1968), 340 - 347.

- [81] K.R. Sheu und P.A. Frey: UDP-glucose Pyrophosphorylase: Stereochemical Course of the Reaction of Glucose-1-Phosphate with Uridine-5' (1-Thio-Triphosphate). *J. Biol. Chem.*, 253, (1978), 3378 - 3380.
- [82] K.R. Sheu, J.P. Richard und P.A. Frey: Stereochemical Courses of Nucleotidyltransferase and Phosphotransferase Action. Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase, Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase, Adenylate Kinase and Nucleotide Diphosphate Kinase. *Biochemistry*, 18, (1979), 5548.
- [83] Y.S. Shin-Bühning, T. Beier, A. Tan, M. Osang und J. Schaub: The Activity of Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase and Galactokinase in Human Fetal Organs. *Ped. Res.*, 11, (1977), 1003 - 1009.
- [84] Y. S. Shin-Bühning, M. Dallinger, M. Osang, P. Rahm und J. Schaub: Lysosomal Enzyme Activities of Human Fetal Organs During Development. *Biol. Neonate*, 38, (1980), 300 - 308.
- [85] Y.S. Shin, H.P. Niedermeier, W. Endres und J. Schaub: Uridine Diphosphogalactose Pyrophosphorylase in Human Tissues in Relevance to Galactosemia. *Abstract. Pediat. Res.*, 15, (1981), 1190.
- [86] Y.S. Shin-Bühning, M. Osang, R. Ziegler und J. Schaub: A Method for Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase Assay and the Separation of its Isoenzymes by DEAE-cellulose Column Chromatography. *Clin. Chim. Acta*, 70, (1976), 371 - 377.
- [87] Y.S. Shin, M. Rieth, W. Endres und J. Schaub. Manuscript in Vorbereitung.
- [88] T.B. Shows, J.A. Brown, A.P. Goggin, L.L. Haley, M.G. Byers und R.L. Eddy: Assignment of a Molecular Form of UDP-glucose Pyrophosphorylase (UGPP₂) to Chromosome 2 in Man. *Cytogen. Cell Gen.*, 22, (1978), 215 - 218.
- [89] J.R. Sidbury, Jr.: Inhibition of Phosphoglucomutase with Galactose-1-Phosphate. *Amer. Chem. Soc.*, 132nd Meeting, New York (1957), 27C - 28C.
- [90] J.R. Sidbury, jr.: The Role of Galactose-1-Phosphate in the Pathogenesis of Galactosemia. In: *Molecular Genetics and Human Disease*, von L.I. Gardner (Hrsg.) Charles C. Thomas, Springfield, Ill., (1961), 61 - 82.
- [91] J.B. Sidbury, Jr.: Investigations and Speculations on the Pathogenesis of Galactosemia. In: *Galactosemia*, von D.Y.Y. Hsia (Hrsg.), Charles C. Thomas, Springfield, Ill. (1969), 13 - 29.
- [92] F. C. Sitzmann, R.D. Schmid und H. Kaloud: Excretion of Galactitol in the Urine of Heterozygotes of Both Forms of Galactosemia. *Clin. Chim. Acta* 75 (1977), 313 - 319.

- [93] T.A. Tedesco und W.J. Mellman: Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase and Galactokinase Activity in Cultured Human Diploid Fibroblasts and Peripheral Blood Leucocytes. I. Analysis of Transferase Genotypes by the Ratio of the Activities of the Two Enzymes. *J. Clin. Invest.*, 48, (1969), 2390 - 2397.
- [94] W.K. Ting und R.G. Hansen: Uridine Diphosphate Galactose Pyrophosphorylase from Calf Liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, (1968), 960 - 962.
- [95] Y.J. Topper, L. Caster und S. Segal: Galactose Metabolism: Phenotypic Differences among Tissues of a Patient with Congenital Galactosemia. *Nature*, 196, (1962), 1006.
- [96] E.H. Townsend, H.H. Mason und R.R. Strong: Galactosemia and its Relation to Laennec's Cirrhosis. *Pediatrics*, 7, (1951), 760 - 773.
- [97] K.K. Tsuboi und P. Hudson: Enzymes of the Human Erythrocyte. I. Purine Nucleotide Phosphotransferase; Isolation Procedure. *J. Biol. Chem.*, 224, (1957), 879 - 887.
- [98] K.K. Tsuboi, K. Fukunaga und J.C. Petricciani: Purification and Specific Kinetic Properties of Erythrocyte Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.*, 244, (1969), 1008 - 1015.
- [99] R.L. Turnquist, T.A. Gillett und R.G. Hansen: Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase. Crystallization and Properties of the Enzyme from Rabbit Liver and Species Comparisons. *J. Biol. Chem.*, 249, (1974), 7695 - 7700.
- [100] R.L. Turnquist, M. Turnquist, R.C. Bachmann und R.G. Hansen: Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase: Differential Heat Inactivation and Further Characterization of Human Liver Enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 364, (1974), 59 - 67.
- [101] H. van Someren, H. Beijersbergen van Henegouwen, W. Los, E. Wurzer-Figurelli, B. Doppert, M. Vervloet und P. Meera Khan: Enzyme Electrophoresis on Cellulose Acetate Gel. II. Zymogram Patterns in Man-Chinese Hamster Somatic Cell Hybrids. *Humangenetik*, 25, (1974), 189 - 201.
- [102] A. Von Reuss: Zuckerausscheidung im Säuglingsalter. *Wien. Med. Wschr.*, 58 (1908), 799.
- [103] W. Wells, T. Pittmann und T. Egan: The Isolation and Identification of Galactitol from the Urine of Patients with Galactosemia. *J. Biol. Chem.*, 239, (1964), 3192 - 3195.

10. LEBENS LAUF

Name: Niedermeier, Hans-Peter
Geburtsdatum: 8. Mai 1958
Eltern: Johann und Susanna Niedermeier, geb. Lukas
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung:

Grundschule: 1964 bis 1968 in Erding
Gymnasium: 1968 bis 1977 in Erding
Abitur im Juni 1977

Medizin studium:

Beginn: im Wintersemester 1977/78 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Ärztliche Vorprüfung: Sommer 1979

Experimentelle

Dissertation: Beginn Frühjahr 1980 an der Kinderklinik der Universität München

Ärztliche Prüfung

I. Abschnitt: Sommer 1980

Ärztliche Prüfung

II. Abschnitt: Sommer 1982

Praktisches Jahr: Beginn im Wintersemester 1982/83 an der Kinderklinik der Universität München

München, im Oktober 1982

